



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στα παράγωγα του αίματος

POST GRADUATE THESIS

The role of microvesicles in blood components

Λαφαζανίδου Ελένη-Κυριακή
Lafazanidou Eleni-Kyriaki

Αναστάσιος Κριεμπάρδης
Anastasios Kriebardis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

The role of microvesicles in blood components

Lafazanidou Eleni-Kyriaki

21013

lafazanidouek@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Anastasios Kriebardis

SECOND SUPERVISOR

Sotirios Fortis

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 05/07/2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Κριεμπάρδης Αναστάσιος	
2 ^{ος} Εξεταστής	Φόρτης Σωτήριος	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Λαφαζανίδου Ελένη-Κυριακή του Νικολάου, με αριθμό μητρώου 21013 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Λαφαζανίδου Ελένη-Κυριακή



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής.

Περίληψη

Εισαγωγή: Η μετάγγιση αποτελεί, παγκοσμίως, μια καθημερινή κλινική πράξη για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της επιβίωση των ασθενών. Από την αρχή της πορείας της μετάγγισης υπάρχει μια διαρκής προσπάθεια αναζήτησης και εφαρμογής νέων μεθόδων για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, τη βελτίωση των τρόπων αποθήκευσης των παραγώγων του αίματος και κατά επέκταση της μείωσης των επιπλοκών. Έτσι σταδιακά εισήχθησαν έννοιες όπως η ομάδα αίματος, ο έλεγχος για λοιμογόνους παράγοντες αλλά και η χρήση συντηρητικών για να παραταθεί ο χρόνος φύλαξης. Παράλληλα, εκτός από το ολικό αίμα, μεταγγίζονται παράγωγα του αίματος όπως τα συμπυκνωμένα ερυθρά, τα αιμοπετάλια και το πλάσμα ώστε να αποφευχθούν οι παρενέργειες της μετάγγισης των συστατικών που δεν χρειάζεται τη συγκεκριμένη στιγμή ο ασθενής. Με την πάροδο του χρόνου και την τεχνολογική εξέλιξη, μεθόδου κυτταρομετρίας ροής και μικροσκοπίου άρχισαν να παρατηρούνται στην κυκλοφορία του αίματος μικρά σωματίδια που ονομάστηκαν μικροκυστίδια (microparticles). Τα μικροκυστίδια έχουν πολύ μικρό μέγεθος που κυμαίνεται από (~50-3000nm) βρίσκονται φυσιολογικά στην κυκλοφορία του αίματος, εκκρίνονται από όλα τα κύτταρα του αίματος και συμμετέχουν στις διαδικασίες της απόπτωσης και της κυτταρικής επικοινωνίας. Η παραγωγή των μικροκυστιδίων συμβαίνει και *ex vivo*, κατά την αποθήκευση των παραγώγων του αίματος.

Υπόθεση: Η αυξημένη παρουσία των μικροκυστιδίων στα παράγωγα του αίματος ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη μετάγγιση λόγω της μεταβολής των βιοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών των παραγώγων του αίματος.

Αποτελέσματα: Ο χρόνος φύλαξης των παραγώγων του αίματος και η επεξεργασία των προϊόντων με τη διαδικασία της λευκαφαίρεσης φάνηκε, στις περισσότερες έρευνες, να επηρεάζουν αρνητικά το σχηματισμό των μικροκυστιδίων. Η πλειοψηφία των μελετών έδειξε ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής των παραγώγων σε ασκούς μειώνεται αυξάνεται σημαντικά η παραγωγή των μικροκυστιδίων. Σημαντικός παράγοντας αποδείχθηκε και το υλικό κατασκευής των ασκών καθώς οι ασκοί με BTHC είναι πιο ευαίσθητοι στο χρόνο αποθήκευσης.

Συζήτηση: Σε όλες τις πρόσφατες μελέτες έγινε καταμέτρηση του αριθμού των μικροκυστιδίων τόσο κατά την ημέρα της λήψης όσο και διαδοχικές μετρήσεις κατά τη διάρκεια του επιτρεπτού χρόνου φύλαξης. Η σύγκριση των λευκαφαιρεμένων από τα μη λευκαφαιρεμένα προϊόντα υπήρξε παράγοντας διερεύνησης σε πολλές έρευνες, καθώς επίσης και η αιμοπεταλιαφαίρεση. Ένας ακόμη πιθανός αιτιολογικός παράγοντας που διερευνήθηκε ήταν το

υλικό του ασκού δηλαδή, η παραγωγή των μικροκυστιδίων να εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ ασκού και περιεχομένου. Ωστόσο, καθώς σε μερικές περιπτώσεις τα δεδομένα δεν είναι σαφή και ολοκληρωτικά ή ακόμα και με αντίθετα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών, περαιτέρω έρευνες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και ασθενών θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για τη διεξαγωγή πιο εμπεριστατωμένου συμπεράσματος.

Λέξεις κλειδιά: Μικροκυστίδια, παράγωγα αίματος, μετάγγιση

Abstract

Introduction: Blood transfusion constitutes, globally, an everyday clinical practice that helps improving the quality of life and survival of patients. Since the beginning of the transfusion, during history, there is a continuous clinical interest of searching new methods and practices for improving the procedure and the storage of blood and blood products and thus reducing all possible complications. Therefore, new methods of testing the quality and compatibility of the transfused blood were introduced, gradually, like the blood type, the infectious diseases tests in addition to the use of additives to extend storage time. At the same time, besides whole blood, blood components have also been transfused like red blood concentrates, platelets and plasma, in order to avoid adverse events of transfuse components the receiver doesn't need at the moment. Throughout technology's evolution of flow cytometry and the microscope, small particles were visible in blood circulation that later called microparticles. Microparticles are very small in size that ranges (~50-3000nm), they occur naturally in circulation, and budding from all blood cells and they are also involved in apoptosis and cell communication. On the other hand, the microvesicle production also happens *ex vivo*, during blood components storing.

Purpose: The presence of Microparticles at high concentration in blood components may cause adverse events after transfusion, because of alterations in biochemistry and structural characteristics of blood components.

Results: The Storage time of the blood components and leukoreduction seems, in most cases, to negatively affect the microparticles production. The majority of the studies involved in this research thesis showed that prolonged storage time gradually increases microparticles formation. The material of the blood bag appears to an additional important factor that influences the formation of the microparticles since blood bags made from BTHC were shown to promote microparticle generation in prolonged storage time.

Discussion: In all recent studies the concentration of microvesicles was measured on the day of the collection and on specific time points during storage time. Many studies compared the results between leukoreduced and non-leukoreduced products and also platelet apheresis. Another factor that was tested was how the blood bag material affects microparticle production. All the above results from these studies were inconclusive on how the concentration of microparticles affects the quality of blood components.

However, in some cases the results are not clear and in other cases oppose further research needs to be conducted with more samples and patients for a more solid conclusion.

Key words: microparticles, blood components, transfusion

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Περίληψη.....	vi
Abstract.....	vii
Συντομογραφίες.....	xi
Πρόλογος.....	1
1. Εισαγωγή.....	3
1.1 Τα κύτταρα του αίματος	3
Τύποι κυττάρων του αίματος.....	3
1.1 Μεταγγίσεις	4
1.2 Ιστορική αναδρομή μεταγγίσεων και της αποθήκευσης των παραγώγων του αίματος	5
1.3 Παρασκευή παραγώγων αίματος	7
1.4 Ποιοτικός έλεγχος παραγώγων αίματος	10
1.5 Τα παράγωγα αίματος στην μετάγγιση	13
1.5.1 Ερυθροκύτταρα	13
1.5.2 Αιμοπετάλια	14
1.6 Τα εξωκυτταρικά κυστίδια	15
1.6.1 Μικροκυστίδια στα κύτταρα του αίματος	18
1.7 Οι μηχανισμοί δημιουργίας των εξωκυτταρικών κυστιδίων κατά την αποθήκευση των παραγώγων του αίματος	18
1.8 Οι λειτουργικές αλλοιώσεις των παραγώγων του αίματος από τον σχηματισμό των EVs κατά την αποθήκευση	21
1.8.1 Εξωκυτταρικά Μικροκυστίδια (EVs) που παράγονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια της κυκλοφορίας από το συμπλήρωμα	23
Κεφάλαιο 2. Αποτελέσματα.....	24
Κεφάλαιο 3. Συζήτηση.....	26
Αναφορές.....	30
Πηγές Εικόνων.....	34

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
AS	additive solution	Πρόσθετο διάλυμα
ACD	Acid Citrate Dextrose solution	Διάλυμα κιτρικού οξέος και δεξτρόζης
BEST	Biomedical Excellence for Safer Transfusion	
CPDA	Citrate phosphate dextrose adenine solutions	Διαλύματα κιτρικής φωσφορικής δεξτρόζης αδενίνης
DEHP	diethylhexyl-phthalate	δισ(2-αιθυλεξυλ) φθαλικός εστέρας
EV	Extracellular Vesicles	Εξωκυτταρικά κυστίδια
FFP	Fresh Frozen Plasma	Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα
GMP	Good Manufacturing Practice	Καλή Κατασκευαστική Πρακτική
HLA	Human Leukocyte Antigens	Ανθρώπινα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας
MAC	Membrane Attack Complex	Σύμπλεγμα επίθεσης της μεμβράνης
miRNAs	microRNA	
MPs	microparticles	μικροσωματίδια
MVs	microvesicles	μικροκυστίδια
PC	Platelet Component	Συστατικό αιμοπεταλίων
PLTs	Platelets	Αιμοπετάλια
RBCC	Red Blood Cell Concentrates	συμπυκνωμένα ερυθρά κύτταρα του αίματος
RCC	Red Cell Concentrates	Συμπυκνωμένα Ερυθρά
RDP	Random donor platelet	Τυχαίος δότης αιμοπεταλίων
SAG	Sodium-adenine-glucose	Νάτριο-αδενίνη-γλυκόζη
SDP	single donor platelets	Μονός δότης αιμοπεταλίων
SMP	Simple Management Protocol	Απλό πρωτόκολλο διαχείρισης
TFPI	tissue factor pathway inhibitor	Αναστολέας μονοπατιού ιστικού παράγοντα

Πρόλογος

Τα μικροκυστίδια (microvesicles, MV) είναι μικρά σωματίδια που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και σε πολλά βιολογικά υγρά, όπως το ENY, τα ούρα και το σάλιο, και υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωσή τους υπολογίζεται μεγαλύτερη από 10^9 κυστίδια/ml και το μέγεθος τους ποικίλει από 50nm έως 1μm (1)(2)(3)(4). Τα μικροκυστίδια απελευθερώνονται από την κυτταρική μεμβράνη σχεδόν όλων των κυττάρων των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών εξαιτίας ανακατατάξεων του κυτταροσκελετού και εκβλαστήσεων της κυτταρικής μεμβράνης, μετά από την επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων όπως η υποξία, το οξειδωτικό στρες και η απόπτωση (1)(5)(4). Η δομή τους περιλαμβάνει μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων που τα περιβάλλει εξωτερικά, στην οποία εκφράζονται υποδοχείς που σχετίζονται με το κύτταρο από το οποίο έχουν προέλθει, και περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και μεταβολίτες που αντιπροσωπεύουν την κυτταρική τους προέλευση και το μηχανισμό απέκκρισής τους (4,5). Σε σχέση με τα υπόλοιπα βιολογικά υγρά, τα μικροκυστίδια βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο πλάσμα, το οποίο περιέχει μικροκυστίδια που προέρχονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (3).

Καθώς τα κυστίδια εκφράζουν στην επιφάνεια τους διάφορα μόρια, τα οποία διαφέρουν ανάλογα με το κύτταρο από το οποίο έχουν παραχθεί, έχουν και διαφορετικές λειτουργίες που σχετίζονται με το κύτταρο προέλευσης (6). Σύμφωνα με μελέτες συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένων της ενδοκυττάριας επικοινωνίας και της μεταφοράς βιομορίων όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, το messenger RNA και το microRNA (6)(4). Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μικροκυστίδια ανευρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις αυτές αυξάνονται σε παθολογικές καταστάσεις και κατά συνέπεια έχει παρατηρηθεί αυξημένο ενδιαφέρον για τις δυνατότητες που μπορεί να έχουν τα μικροκυστίδια ως βιοδείκτες, είτε ως σύστημα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών ή και ακόμα ένα νέο πιθανό ρόλο σε διάφορες βιολογικές και παθολογικές διαδικασίες (4,6). Η φυσιολογική παρουσία τους στην κυκλοφορία του αίματος και οι ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ανοίγουν ένα νέο πεδίο ερευνών τόσο για τις λειτουργίες τους, όπως η μεταφορά ουσιών όσο και για τη συνεισφορά τους στην κυτταρική επικοινωνία και την ομοιοστάση αντιμετωπίζοντας προκλήσεις που προκύπτουν συγκριτικά με άλλα μόρια που χρησιμοποιούνται για το ρόλο αυτό (4,7). Τα μικροκυστίδια φαίνεται επίσης να συσχετίζονται με την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης του αίματος. Αυτός ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην πήξη του αίματος φαίνεται να

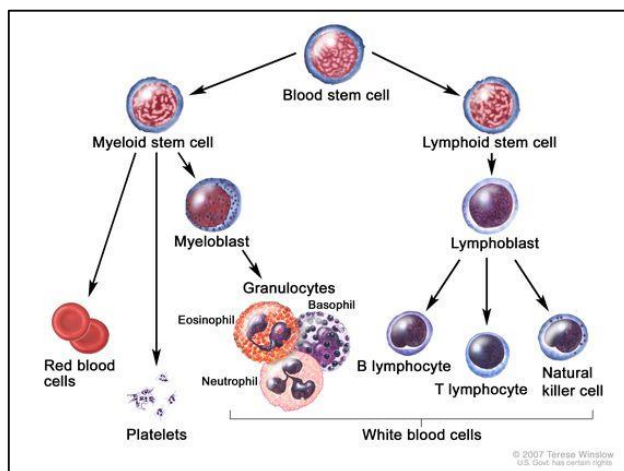
υποστηρίζεται τόσο από ορισμένες πρωτεΐνες που φέρουν στην επιφάνεια τους τα κυστίδια και είναι υπεύθυνες για την επαγωγή της πήξης όσο και από την αρνητικά φορτισμένη διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων που τα περιβάλλει (8).

Η συσχέτιση αυτή των μικροκυστιδίων με την ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού φαίνεται να έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα. Οι παγκόσμιες ανάγκες αίματος σε μεταγγιζόμενους ασθενείς είναι μεγάλες και διαρκείς καθώς υπάρχουν ομάδες ανθρώπων που χρειάζονται πολλαπλές μεταγγίσεις, όπως οι καρκινοπαθείς ή οι πάσχοντες από θρομβοπενία. Εκτός όμως από τους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, υπάρχουν και οι έκτακτες περιπτώσεις που χρειάζεται μετάγγιση όπως ένα μεγάλο χειρουργείο (9). Πάνω από 1 εκατομμύριο μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών μεταγγίζονται στον Καναδά ετησίως, περίπου 12 εκατομμύρια στις ΗΠΑ και περισσότερες από 90 εκατομμύρια μονάδες μεταγγίζονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο (4,10). Η ανάγκη για αποτελεσματικότερη φύλαξη των παραγώγων του αίματος που προορίζονται για μετάγγιση αποτελεί στόχο βελτίωσης των τεχνικών αποθήκευσης ώστε τα παράγωγα του αίματος να διατηρούνται όσο το δυνατόν υγιή και φρέσκα. Πιο συγκεκριμένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η *ex vivo* παραγωγή των μικροκυστιδίων κατά τη συντήρηση των ασκών με παράγωγα του αίματος που προορίζονται για μετάγγιση (2,10). Γνωρίζοντας τις μεγάλες ανάγκες για μετάγγιση των παραγώγων του αίματος στην κλινική πράξη καθώς και τις ανάγκες για βελτιστοποίηση των συνθηκών συντήρησης των ασκών της αιμοδοσίας και έχοντας ως δεδομένο τις νέες ιδιότητες των μικροκυστιδίων θα διερευνηθεί ο συσχετισμός της ύπαρξης των μικροκυστιδίων με την πρόκληση επιπλοκών στους μεταγγιζόμενους. Η παρούσα διπλωματική εργασία θα εστιάσει συγκεκριμένα κατά πόσο η παραγωγή μικροκυστιδίων σχετίζεται με την παρατεταμένη αποθήκευση των παραγώγων του αίματος από τη λήψη μέχρι τη μετάγγιση.

1. Εισαγωγή

1.1 Τα κύτταρα του αίματος

Το αίμα περιέχει το πλάσμα, το υγρό συστατικό, τους παράγοντες πήξης καθώς και πολλούς διαφορετικούς τύπους αιμοσφαιρίων. Το αίμα είναι σημαντικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του οργανισμού καθώς ρυθμίζει το pH του σώματος, τη θερμοκρασία, την οσμωτική πίεση, την κυκλοφορία των θρεπτικών ουσιών και την απομάκρυνση των αποβλήτων, την κατανομή των ορμονών από τους ενδοκρινείς αδένες και την αποβολή της περίσσειας θερμότητας (52). Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι κυττάρων στο αίμα τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (εικόνα 1). Οι διαφορετικοί τύποι των κυττάρων που εντοπίζονται στο αίμα είναι τα λευκοκύτταρα, τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια οι συγκεκριμένες των οποίων έχουν καθοριστεί στο αίμα φυσιολογικών ατόμων (εικόνα 2).



Εικόνα 1. Τα κύτταρα του αίματος προκύπτουν από ένα βλαστοκύτταρο. (α)

Τύποι κυττάρων του αίματος

- Λευκοκύτταρα

Είναι τα κύτταρα της άμυνας του οργανισμού, του ανοσοποιητικού συστήματος που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις φλεγμονής. Οι βασικοί τύποι λευκοκυττάρων του αίματος είναι:

- ✓ Τα κοκκιοκύτταρα (Ουδετερόφιλα, Ηωσινόφιλα, Βασεόφιλα)
- ✓ Λεμφοκύτταρα (B-λεμφοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα)
- ✓ Μονοκύτταρα

- Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθροκύτταρα μεταφέρουν το οξυγόνο από τους ιστούς σε όλα τα κύτταρα του σώματος και τους ιστούς και αυτό επιτυγχάνεται από την πρωτεΐνη αιμογλοβίνη που είναι πρωτεΐνη μεταφορέας.

- Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι τα κύτταρα του αίματος που ευθύνονται για την πήξη του αίματος. Οι φυσιολογικές τιμές των κυττάρων και της αιμογλοβίνης στο περιφερικό αίμα ενός υγιούς ατόμου φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 2).

Blood cell or substance	Levels found in a healthy person
Haemoglobin (Hb) level (for red blood cells)	130–180 g/l (men) 115–165 g/l (women)
Platelets	150–400 x 10 ⁹ /l
White blood cells (WBC)	4.0–11.0 x 10 ⁹ /l
Neutrophils	2.0–7.5 x 10 ⁹ /l
Lymphocytes	1.5–4.5 x 10 ⁹ /l

Εικόνα 2. Τα επίπεδα των κυττάρων που βρίσκονται σε ένα υγιές άτομο ανά τύπο κυττάρου (b)

1.1 Μεταγγίσεις

Τα παράγωγα του αίματος καλύπτουν τις ανάγκες των ασθενών για μετάγγιση. Τα πιο συχνά μεταγγιζόμενα παράγωγα είναι τα ερυθροκύτταρα, το πλάσμα και τα αιμοπετάλια. Ο διαχωρισμός αυτός των συστατικών και η επιλεκτική μετάγγιση τους, όπου είναι απαραίτητα, προλαμβάνουν την λήψη περιττού όγκου αίματος καθώς ο μεταγγιζόμενος λαμβάνει μόνο τα προϊόντα του αίματος που έχει ανάγκη κάθε φορά εξασφαλίζοντας έτσι κλινική αποτελεσματικότητα.

Οι εξελίξεις στον χαρακτηρισμό των αιμοπεταλίων και των ερυθροκυττάρων ήταν εντυπωσιακές τις τελευταίες δύο δεκαετίες καθώς υπάρχει μια πληθώρα παραμέτρων που μπορούν να αξιολογηθούν. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν ακόμη πολλοί δείκτες που πρέπει να ανακαλυφθούν όπως πρόσφατα αποδεικνύεται από τη δυναμική της πρωτεωμικής, για παράδειγμα, τέτοιες παράμετροι μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες για την παρακολούθηση της ποιότητας των παραγώγων του αίματος (Blood Components) (11).

Οι ανάγκες για τη διαχείριση του αίματος αποτελεί ένα μείζον διαχρονικό θέμα για τα συστήματα υγείας στην Ευρώπη. Κυρίως στην Ελλάδα, όπου η προσφορά αίματος από τους εθελοντές είναι μικρότερη από τις απαιτήσεις της ζήτησης, και επιπλέον η Ελλάδα έχει παραδοσιακά να διαχειριστεί ασθενείς με μεσογειακή αναιμία και διάφορες αιμοσφαιρινοπάθειες οπότε η ανάγκη για τη διασφάλιση μονάδων αίματος για την κάλυψη των απαιτούμενων μεταγγίσεων είναι ιδιαίτερος αυξημένη. Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε τον πιθανό κίνδυνο μη επάρκειας κάλυψης των μελλοντικών αναγκών σε μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων των ασθενών με αναιμίες για τα επόμενα 15 έτη (12).

1.2 Ιστορική αναδρομή μεταγγίσεων και της αποθήκευσης των παραγών του αίματος

Η ιστορία της μετάγγισης αίματος ξεκινά ήδη από το 1628 όταν περιγράφηκε, από τον Άγγλο γιατρό William Harvey, το κυκλοφορικό σύστημα του αίματος και το αίμα θεωρήθηκε ως το ποτάμι της ζωής. Η πρώτη συσκευή ένεσης του μεταφερόμενου αίματος σχεδιάστηκε το 1965, ενώ οι πρώτες μεταγγίσεις πραγματοποιήθηκαν το 1665 μεταξύ ζώων ή από ζώο σε άνθρωπο από το γιατρό Richard Lower. Στις αρχές του 1890 το κιτρικό οξύ έδειξε τις πρώτες ιδιότητες του ως αντιπηκτικό βοηθώντας έτσι τη συλλογή αίματος για τις μεταγγίσεις (13). Οι έκτακτες ανάγκες των τραυματισμένων στρατιωτών κατά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο, το 1914, ανάγκασαν τότε έναν Γάλλο γιατρό να πραγματοποιήσει την πρώτη απόπειρα μετάγγισης αίματος χέρι με χέρι στους πολυτραυματίες (11). Το 1916, οι Rous και Turner πέτυχαν τη συντήρηση των ερυθροκυττάρων αναφέροντας μικρότερη αιμόλυση στα ερυθροκύτταρα κουνελιών που είχαν αποθηκευτεί στον πάγο για 4 εβδομάδες σε διάλυμα κιτρικού οξέος και γλυκόζης (13). Παράλληλα με την εφαρμοσμένη διαδικασία της μετάγγισης ξεκινά και η ιστορία των προβλημάτων και των βλαβών του συλλεγόμενου αίματος κατά την αποθήκευση, σχεδόν ταυτόχρονα δηλαδή με την ιατρική της μετάγγισης. Μετά την πρόοδο των διαδικασιών αντιπηκτικής αγωγής και βραχυπρόθεσμης συντήρησης, το αίμα εμφιαλώθηκε και μεταγγίστηκε χωρίς την απαραίτητη επαφή μεταξύ του δότη και του ασθενούς, ενώ παράλληλα η συντήρηση του συλλεγόμενου αίματος βελτιώθηκε μέχρι το 1943 όταν και εμφανίστηκε ξανά η ανάγκη για μαζικές μεταγγίσεις κατά το δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο. Πλέον το αίμα συντηρείται σε διάφορα διαλύματα αλάτων κιτρικού νατρίου και σε θερμοκρασία 3-7°C και έως το 1957 είχαν οριστικοποιηθεί οι συνθήκες PH, οσμωτικής πίεσης, θερμοκρασίας, αντιπηκτικών και συντηρητικών υπό τις οποίες διατηρούνταν το μεταγγιζόμενο αίμα ως και 3 εβδομάδες.

Το 1952 αναπτύχθηκε το κλειστό σύστημα αποθήκευσης σε ασκούς του συλλεγόμενου αίματος που προορίζεται για μετάγγιση. Το σύστημα αυτό φαίνεται να υπερείχε των γυάλινων δοχείων μειώνοντας τον κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης λόγω της επαφής με τον ατμοσφαιρικό αέρα αλλά είχε και μικρότερο βάρος και ευκολία στην αποθήκευση. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η συντήρηση στους ασκούς έχει ως αποτέλεσμα μικρότερα επίπεδα καλίου συγκριτικά με τα γυάλινα μπουκάλια πιθανά λόγω του χημικού συστατικού diethylhexyl-phthalate (DEHP) που απελευθερώνεται από το πλαστικό και επηρεάζει τις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων. Στις ΗΠΑ, αρχές του 1980, η αδενίνη προστέθηκε ως ενισχυτικό συντήρησης στις ασκητικές συλλογές και με τη μορφή διαλύματος που αποτελείται επιπλέον από άλατα, γλυκόζη καιμανιτόλη (SAGM) ή μαζί με τα διαλύματα CPDA-1 and CPDA-2 (περιέχουν κιτρικό οξύ και δεξτρόζη) για την ελάττωση της αιμόλυσης του αποθηκευμένου αίματος. Τα ενισχυτικά αυτά διαλύματα είναι τα δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στην κλινική πράξη. Παράλληλα είχε ξεκινήσει η χρήση συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων και η μετάγγιση ολικού αίματος είχε ελαττωθεί. Τα επιπρόσθετα χημικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στα νοσοκομειακά τμήματα των μεταγγίσεων, παγκοσμίως, προέρχονται από τα SAG και ονομάζονται επιπρόσθετα διαλύματα (AS)-1, AS-3, and AS-5. Μια νέα προσέγγιση προς τη βελτίωση των μεταγγίσεων είναι η απομάκρυνση των λευκοκυττάρων πριν ή κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του αίματος (13).

Οι συσκευές μετάγγισης διαχωρίζονται στις απλές και σε αυτές που έχουν φίλτρο κατακράτησης λευκών. Τα φίλτρα λευκαφαίρεσης των μεταγγιζόμενων ΣΕ (συμπυκνωμένα ερυθρά-θεωρούνται όταν ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη μονάδα αίματος είναι $<1 \times 10^6$) αποσκοπεί στη μείωση των πυρετικών και όταν δεν υπάρχουν λευκαφαιρέμενα πριν την αποθήκευση των παραγώγων. Τα φίλτρα λευκαφαίρεσης επίσης μπορούν να μειώσουν περισσότερο τον αριθμό των λευκών στα ΣΕ μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο για αλλοευσαιθητοποίηση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (Human Leukocyte Antigen), εμφάνισης πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων, μετάδοση του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Επιπρόσθετα τα δυο επιπλέον είδη φίλτρων που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των παραγώγων του αίματος είναι τα φίλτρα ερυθρών και τα φίλτρα των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν φίλτρα ενσωματωμένα στον ασκό συλλογής του αίματος για καθολική αφαίρεση των λευκών και εργαστηριακά φίλτρα για επιλεκτική λευκαφαίρεση. Τα μηχανήματα αυτομετάγγισης απομακρύνουν το 90% των άχρηστων προσμίξεων, οπότε μεταγγίζεται φρέσκο και αυτόλογο αίμα χωρίς μεγάλες απώλειες στον όγκο αλλά και σε περιπτώσεις των καρκινικών κυττάρων η χρήση του φίλτρου μειώνει τα κύτταρα αυτά από το συλλεχθέν αίμα. Κριτήρια μετάγγισης

- Η μόνη ένδειξη για μετάγγιση ερυθρών είναι η διόρθωση ή η πρόληψη της υποξίας των ιστών χρησιμοποιώντας του δείκτες Hb και Hct
- Ασθενείς με Μεσογειακή αναιμία, δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα, θρομβοπενία, ασθενείς σε εγχείρηση, μαζική απώλεια αίματος από τραυματισμό (53).

Η ανάγκη για βελτιστοποίηση των μεθόδων μετάγγισης είναι συνεχής καθώς οι ανάγκες της αιμοδοσίας συνεχώς αυξάνονται. Όλα τα στάδια από τη συλλογή, την αποθήκευση και την έγχυση του αίματος χρήζουν βελτίωσης. Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται μέχρι σήμερα τα συστατικά του αίματος συλλέγονται μετά από επεξεργασία ολόκληρου του αίματος μετά τη λήψη από εθελοντές αιμοδότες ή απομονώνονται κατευθείαν μέσω της διαδικασίας της αφαίρεσης με ειδικές συσκευές στα επιμέρους κλάσματα του αίματος. Η επεξεργασία και η φύλαξη των συστατικών του αίματος σε διαφορετικές συνθήκες επιτρέπει τη διαφοροποίηση των συνθηκών αποθήκευσης, τακτική που επιτυγχάνει τις βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης για κάθε συστατικό χωριστά ανάλογα με τις ιδιότητες του. Ακολούθως τα αποθηκευμένα διαφορετικά συστατικά του αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωριστά ανάλογα με την κλινική περίπτωση και την παθολογική κατάσταση των ασθενών (11). Το αίμα που συλλέγεται από τους αιμοδότες επεξεργάζεται 1-2 ημέρες πριν χορηγηθεί στους ασθενείς που το χρειάζονται. Η κλασμάτωση του αίματος στα επιμέρους συστατικά του περιλαμβάνει την απομόνωση: 1) των ερυθροκυττάρων (Red Blood Cell Concentrates-RBCC) και αποθηκεύονται στους 4°C 2) των αιμοπεταλίων (Platelet Component-PC) τα οποία αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (~22°C) υπό συνεχή ανάδευση 3) πλάσμα (παγωμένο πλάσμα έως τη χρήση του Fresh Frozen Plasma-FFP). Στα περιστατικά της εντατικής είναι εντυπωσιακό ότι οι γιατροί χρησιμοποιούν 4 μονάδες RBCCs, 4 μονάδες FFP και 6 PC ώστε να επιτύχουν την ανάκτηση όλων των συστατικών του αίματος (13).

1.3 Παρασκευή παραγώγων αίματος

- Εισαγωγή αποστειρωμένων συστημάτων πολλαπλών ασκών

Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασκών σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες είναι η υψηλή ποιότητα, διαπερατότητα, ικανότητα ανταλλαγής αερίων και διατήρησης pH και πλήρης διαύγεια του πλαστικού (σύμφωνα με το ISO3826-1 Q2003 παρ.6.2.4.). Επιπλέον τα συστήματα των ασκών απαιτείται να είναι αποστειρωμένα, μη εύθραυστα και ελεύθερα από πυρετογόνες ουσίες και να εξασφαλίζουν φυσικά την ασφαλή συλλογή και αποθήκευση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του ISO 3826 § 4.1 ο ασκός θα πρέπει να φέρει ασφαλείς συγκολλήσεις περιμετρικά χωρίς περιττές απολήξεις πλαστικού προς αποφυγή συγκέντρωσης μικροβίων. Ο

ασκός στο εσωτερικό του δεν θα πρέπει να παρουσιάζει ανωμαλίες πλαστικού ή συγκολλήσεων, χωρίς γωνίες για την αποφυγή μικροθρόμβων. Επιπρόσθετα ο πρωτεύον ασκός είναι υποχρεωτικό να φέρει ενσωματωμένη συσκευή αιμοληψίας από πλαστικό σωλήνα άριστης ποιότητας με συγκεκριμένες διαστάσεις (54).

Το 1952 χρησιμοποιήθηκε από τον Walter για τη συλλογή αίματος πλαστικός ασκός ο οποίος περιείχε CPD. Από έναν ασκό ολικού αίματος έχουμε τη δυνατότητα να απομονώσουμε:

- τα ασταθή προϊόντα (ερυθρά αιμοσφαίρια, πλάσμα αίματος, και αιμοπετάλια)
- Σταθερά ή βιομηχανοποιημένα κλάσματα (λευκοματίνη-αλβουμίνη, σφαιρίνες, ινωδογόνο, παράγοντες πήξης όπως VII, VIII και XI, αναστολείς πήξεως όπως Αντιθρομβίνη III, η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S, η πρωτεΐνη Z και ο αναστολέας του μονοπατιού του Ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor - TFPI).
- Χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνολογίες όπως η αιμαφαίρεση, δίνεται η δυνατότητα συλλογής απομονωμένων στοιχείων, κυρίως ασταθών, του αίματος όπως είναι το φρέσκο πλάσμα (πλασμαφαίρεση), τα αιμοπετάλια (αιμοπεταλιαφαίρεση), τα λευκοκύτταρα (λευκαφαίρεση), τα λεμφοκύτταρα (λεμφοκυτταροφαίρεση), τα νεαρά ερυθροκύτταρα και τα προγονικά κύτταρα περιφερικού αίματος.

Η σωστή συλλογή, τα κατάλληλα μέσα επεξεργασίας και συντήρησης του συλλεγόμενου αίματος εξασφαλίζει την επιβίωση των έμμορφων συστατικών, τη λειτουργικότητα και διαφυλάσσει την ασηψία δηλαδή προλαμβάνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών.



Εικόνα 3. Τριπλός ασκός συλλογής αίματος

Σε ασηπτικές συνθήκες πραγματοποιείται η λήψη του αίματος του δότη σε πλαστικούς ασκούς μιας χρήσης οι οποίοι βρίσκονται υπό ανακίνηση. Οι ασκοί περιέχουν αντιπηκτικές ουσίες σε συγκεκριμένες αναλογίες ενώ παράλληλα φέρουν χαρακτηριστικά

σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες φαρμακοποιίας σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 9001, 9002, 3826/93 GMP, CE, FDA, SMP/OQW. Στην περίπτωση που πρόκειται να παραχθούν πλάσμα ή αιμοπετάλια ο ασκός πρέπει να είναι διπλό/τριπλός ή τετραπλός δηλαδή ένας ασκός με αντιπηκτικό στον οποίο γίνεται η αιμοληψία και ένας, δύο ή τρεις ασκοί ενώνονται με τον κυρίως ασκό με κλειστό κύκλωμα (εικόνα 3).

Τα δύο βασικά στοιχεία για την σωστή και αποτελεσματική συντήρηση του αίματος είναι η χρήση του σωστού αντιπηκτικού και συντηρητικού και η θερμοκρασία. Τα αντιπηκτικά θα προσφέρουν σωστή αντιπηκτική δράση αποφεύγοντας τη δημιουργία θρόμβων ενώ θα χορηγήσει και τις απαραίτητες ουσίες για το μεταβολισμό των κυττάρων.

- Χρήση αντιπηκτικών και συντηρητικών

Το πρώτο αντιπηκτικό ήταν το ACD (Acid Citrate Dextrose solution) που προσφέρει δυνατότητα συντήρησης για 21 μέρες. Η προσθήκη αδενίνης στο παραπάνω δίλλημα προσφέρει εκτενέστερη συντήρηση στο αίμα έως και 28 ημέρες. Επιπρόσθετα τα CPD προσφέρει 35 μέρες συντήρησης ενώ το CP2D 42 μέρες. Ακόμα δύο αντιπηκτικά χρησιμοποιούνται ευρέως το CPD-A και SAG-M τα οποία συντηρούν το ολικό αίμα και τα ερυθρά για 35 και 42 μέρες αντίστοιχα (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Οι ιδιότητες των κυριότερων αντιπηκτικών ουσιών

Συστατικά αντιπηκτικών	Ιδιότητες
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	Ισοτονικότητα και ωσμωτική ισχύ
Όξινο Φωσφορικό Νάτριο	Ισοτονικότητα και ωσμωτική ισχύ
Μονοφωσφορικό Νάτριο	Πρωθεί παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)
Κιτρικά ιόντα	Αναστέλλουν την πήξη, επιβραδύνουν τη γλυκόλυση οπότε και το μεταβολικό ρυθμό
Κιτρικό οξύ	Ρυθμίζει το pH για καλύτερη επιβίωση των ερυθρών
Αδενίνη	Απαραίτητη για την επιβίωση των ερυθρών, βοηθάει στην παραγωγή ATP
Δεξτρόζη	Απαραίτητη για την επιβίωση των ερυθρών, βοηθάει στην παραγωγή ATP
Μαννιτόλη	Βοηθάει για την ακεραιότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και προστατεύει τα ερυθρά από αιμόλυση

- Δυνατότητα φυγοκέντρησης μεγάλων όγκων

Οι ιδιότητες των κυττάρων του αίματος όπως το μέγεθος, το ιζώδες και η πυκνότητα αποτελούν τους βασικούς παράγοντες για την επιλογή της μεθόδου διαχωρισμού των συστατικών του αίματος. Τα παράγωγα του αίματος διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φυγοκέντρησης παρουσία ή μη φίλτρων.

1.4 Ποιοτικός έλεγχος παραγώγων αίματος

Ίσως το σημαντικότερο στάδιο κατά τις μεταγγίσεις είναι ο ποιοτικός έλεγχος των παραγώγων του αίματος καθώς είναι το στάδιο το οποίο καθορίζει την ολοκλήρωση της μετάγγισης. Έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας στην μετάγγιση των ερυθρών αιμοσφαιρίων τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, καθώς τα πρότυπα ασφαλείας έχουν βελτιωθεί σε μεγάλο βαθμό και η μέριμνα έχει μετατοπιστεί από την ασφάλεια των μεταγγιζόμενων προϊόντων στην ποιότητα. Τα παράγωγα του αίματος διαθέτουν συγκεκριμένα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να διατηρούνται μέχρι να φτάσουν στο δέκτη. Τα ποιοτικά αυτά κριτήρια των παραγώγων του αίματος προς μετάγγιση έχουν καθοριστεί σε συγκεκριμένες οδηγίες από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο προς διασφάλιση της καλύτερης ποιότητας μετάγγισης προς τον ασθενή. Τα στάδια του ποιοτικού ελέγχου περιλαμβάνουν έλεγχο όλων των σταδίων και των διαδικασιών ξεκινώντας από την επιλογή του δότη, τη συλλογή, την επεξεργασία και την αποθήκευση του αίματος αλλά και τον έλεγχο της καλής λειτουργικότητας των παραγώγων του αίματος όπως των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η επαρκής συγκέντρωση των παραγόντων πήξης, η επαρκής συγκέντρωση των αιμοπεταλίων και η μικροβιακή τους στειρότητα. Ο ποιοτικός έλεγχος επεκτείνεται και στα μέσα του τεχνικού εξοπλισμού καθώς εξασφαλίζει τη σωστή θερμοκρασία η οποία ελέγχεται με συστήματα συνεχούς καταγραφής, θερμομέτρα και συναγερμούς και την αποτελεσματικότητα της φυγοκέντρωσης καθώς οι φυγόκεντροι ελέγχονται με σέρβις σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η βακτηριακή μόλυνση είναι ένας από τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε θνησιμότητα των ασθενών έως και 60% δεδομένου ότι συμβαίνει συχνότερα στα αιμοπετάλια παρά στα ερυθρά.

Οι τρέχουσες πρακτικές επιτρέπουν τη φύλαξη των ερυθρών για μεγάλα χρονικά διαστήματα με την προσθήκη συντηρητικών διαλυμάτων διατηρώντας ταυτόχρονα μεγάλο μέρος της λειτουργικότητας και της βιωσιμότητας τους, ωστόσο διαρκής αποδόμηση λαμβάνει χώρα κατά τη φύλαξη. Ωστόσο οι νέες οδηγίες ποιοτικού ελέγχου στην Ευρώπη και τον Καναδά προτείνουν την τακτική της αξιολόγηση των δεικτών που σχετίζονται με την ποιότητα των παραγώγων του αίματος, λαμβάνοντας ένα μικρό δείγμα (<1%) από τις μονάδες που είναι αποθηκευμένες. Οι μονάδες αυτές αξιολογούνται κοντά στην ημερομηνία λήξης τους για αιμόλυση και υπολείμματα λευκών αιμοσφαιρίων. Ωστόσο, λόγω σημαντικής μεταβλητότητας του αίματος που προκύπτει από το φύλο και τη διαφορετικότητα του κάθε δότη, η ποιότητα του αποθηκευμένου αίματος ποικίλλει σημαντικά και κάποιες μονάδες μπορεί να μην πληρούν τα κριτήρια μετάγγισης πολύ πριν τις 42 μέρες, ενώ άλλες μονάδες

μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αρκετό χρονικό μετά το επιτρεπόμενο χρονικό διάστημα φύλαξης. Έτσι προκύπτει ότι η ικανότητα να προσδιοριστούν αυτές οι παράμετροι στους ασκούς των ερυθρών χωρίς την επιμόλυνσή τους, θα ήταν αρκετά ωφέλιμο στη βελτίωση της διαχείρισης της αποθήκευσής τους αλλά και στην αξιολόγηση της ασφάλειας και της ποιότητας της μονάδας πριν αυτή μεταγγιστεί. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποια μέθοδος για την εκτίμηση της ποιότητας κάθε ασκού συμπυκνωμένων ερυθρών χωρίς να θέτει σε κίνδυνο την στειρότητα του ασκού (14).

Στον ποιοτικό έλεγχο των ερυθρών αιμοσφαιρίων διασφαλίζεται η καλή ποιότητα των ερυθρών ώστε να αποφευχθεί η χορήγηση κακής ποιότητας ερυθρών. Τα βασικά χαρακτηριστικά που ελέγχονται είναι οι μονάδες αιμοσφαιρίνης, ο αριθμός των λευκών και ο όγκος των ερυθροκυττάρων. Κατά την αποθήκευση των ερυθρών, η γλυκόζη που βρίσκεται στο συντηρητικό διάλυμα μειώνεται ενώ αυξάνεται το γαλακτικό οξύ. Οι αλλαγές αυτές υποδεικνύουν τη μεταβολική δραστηριότητα που συμβαίνει εντός του ασκού κατά τη συντήρηση, αποτελώντας πιθανοί δείκτες του ρυθμού και του εύρους με το οποίο δημιουργούνται οι αλλοιώσεις.

Οι μεταβολικές και βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στα ερυθροκύτταρα κατά την αποθήκευση έχουν μελετηθεί εκτενώς, καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν το πιο συχνά μεταγγιζόμενο παράγωγο του αίματος και μπορούν να σώσουν τη ζωή κάποιου ακόμα και αν δεν είναι διαθέσιμα άλλα παράγωγα (15). Επίσης η μετάγγιση ερυθρών θεωρείται ο πιο γρήγορος τρόπος αύξησης της αιμοσφαιρίνης (16). Ο κύκλος ζωής των ερυθρών στην κυκλοφορία του αίματος είναι 120 ημέρες (17) και καθορίζεται από την αιμόλυση που έχει παρατηρηθεί *in vitro* (18). Κατά την αιμοδοσία, το αίμα διαχωρίζεται στα συμπυκνωμένα ερυθρά (Red Cell Concentrate, RCC) από τα οποία έχουν αφαιρεθεί τα λευκά αιμοσφαίρια και σε πολλές περιπτώσεις και τα αιμοπετάλια (17). Με τον όρο “βλάβες που προκύπτουν κατά την αποθήκευση” (storage lesions) εννοούμε τις αλλαγές που προκύπτουν στα παράγωγα του αίματος, (15) ακόμα και κατά την ορθή αποθήκευσή τους στους 4°C στην τράπεζα αίματος, όπως έχει αποδειχθεί σε *in vitro* μελέτες (19). Οι αλλαγές αυτές αφορούν τόσο το μεταβολισμό των ερυθρών όσο και τη φυσιολογία του. Οι μεταβολικές αλλαγές περιλαμβάνουν μείωση του pH, μείωση των συγκεντρώσεων της 5'-τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenine Trisphosphate, ATP). Οι μεταβολές στη φυσιολογία των ερυθρών περιλαμβάνουν απώλεια της κυτταρικής μεμβράνης και σχετίζονται με αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου. Κατά την αποθήκευση των κυττάρων απώλειες της κυτταρικής μεμβράνης, των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών προκύπτουν από μία πληθώρα μηχανισμών. Όταν το οξειδωτικό στρες επιδρά στις πρωτεΐνες μειώνει την ακεραιότητα του

κυτταροσκελετού και δημιουργεί νεο-αντιγόνα. Η απώλεια των σακχάρων της μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Όσο αυξάνεται ο χρόνος φύλαξης των κυττάρων, τα κύτταρα που επιβιώνουν και μπορούν να κυκλοφορήσουν στο δότη μειώνονται. Αντίθετα, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη στην εξωτερική τους επιφάνεια αυξάνεται, και η απομάκρυνση αυτών των κυττάρων μπορεί να παρέμβει με τη λειτουργία των μακροφάγων. Η φύλαξη των ερυθρών συσχετίζεται επίσης με την εξοκυττάρια συσσώρευση καλίου και την αποβολή πρωτεϊνών, λιπιδίων, μικροκυστιδίων και βακτηριακή επιμόλυνση (15). Σύμφωνα με την έρευνα των Purvis και των συνεργατών του, βρέθηκε ότι καθώς το αίμα που βρίσκεται στους ασκούς “γερνά”, ένας μεγάλος αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων αναπτύσσει αλλοιώσεις που τα κάνει πιο επιρρεπή στη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα του δέκτη. Καθώς κατά τη φαγοκυττάρωση απελευθερώνεται αιμοσφαιρίνη, διαχέονται στην κυκλοφορία μεγάλες ποσότητες αδέσμευτου σιδήρου, που έχει συσχετιστεί με υψηλά ποσοστά λοιμώξεων (19). Ένα ακόμη ερώτημα που προκύπτει από τις αλλοιώσεις που υφίστανται τα ερυθρά κατά την αποθήκευσή τους είναι αν τα μεταγγιζόμενα ερυθρά μεταφέρουν οξυγόνο το ίδιο αποτελεσματικά με τα ερυθρά που ήδη υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος (20).

Στο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP) ο ποιοτικό έλεγχος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των επιπέδων του πιο ασταθούς συστατικού που είναι ο παράγοντας FVIII. Ταυτόχρονα η ποιότητα του πλάσματος εξαρτάται και από τις διαδικασίες που εφαρμόστηκαν κατά τη συλλογή, την αποθήκευση με αντιπηκτικά αλλά και κατά τη φυγοκέντρηση. Οι αντιπηκτικοί παράγοντες που εμπεριέχονται στους ασκούς συλλογής αναστέλλουν την πήξη επιτρέποντας την αποθήκευση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η καθαρότητα του πλάσματος είναι ακόμη μία παράμετρος που πρέπει να ελεγχθεί κατά τον ποιοτικό έλεγχο καθώς οι προσμίξεις λευκοκυττάρων στο πλάσμα έχουν ενοχοποιηθεί για ανεπιθύμητες αντιδράσεις στους λήπτες. Προτεινόμενη λύση είναι η λευκαφαίρεση υπό κατάλληλες συνθήκες. Τέλος, μέρος του ποιοτικού ελέγχου είναι η παρατήρηση των χρωματικών αλλοιώσεων ή των ορατών θρόμβων.

Οι οδηγίες για τον ποιοτικό έλεγχο των αιμοπεταλίων περιλαμβάνουν οπτική παρατήρηση, μέτρηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως το pH το οποίο πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 6.4 και μικρότερο από 7.4 καθώς και η θερμοκρασία 22°C. Επίσης καταμετρείται ο όγκος, ο αριθμός των αιμοπεταλίων αλλά και τα υπολειπόμενα λευκοκύτταρα. Κατά την οπτική παρατήρηση ελέγχονται τυχόν διαρροές, δυσχρωματισμοί και το φαινόμενο της περιδίνησης το οποίο στηρίζεται στη σκέδαση του φωτός από τα αιμοπετάλια που φέρουν φυσιολογική μορφολογία.

Στον ποιοτικό έλεγχο περιλαμβάνονται και τα τεστ για μολυσματικούς παράγοντες ή όπως αλλιώς ονομάζονται TTI testing, για μολυσματικούς παράγοντες HIV αντισώματα, Αντι-HCV, Hepatitis B αντισώματα, Malaria και Τρυπανόσωμα) (55).

1.5 Τα παράγωγα αίματος στην μετάγγιση

1.5.1 Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθροκύτταρα (Red blood cells) περιέχουν την αιμοσφαιρίνη και είναι τα κύτταρα του αίματος που ευθύνονται για τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς καθώς και για τη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς προς τους πνεύμονες. Λόγω του σημαντικού αυτού ρόλου που έχουν στο κυκλοφορικό σύστημα αποτελούν τα πιο συχνά μεταγγιζόμενα συστατικά του αίματος παγκοσμίως. Τα ερυθροκύτταρα μεταγγίζονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η αναιμία, η ξαφνική απώλεια αίματος (>30% του συνολικού όγκου αίματος) καθώς και η δρεπανοκυτταρική νόσος ώστε να επιτευχθεί η επανάκτηση της μεταφοράς του οξυγόνου στους ιστούς. Ωστόσο, τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα από τους αιμοδότες δεν φαίνεται να είναι ίδια σε ποιότητα με τα φρέσκα ληφθέντα ερυθροκύτταρα οπότε αυτό αποτελεί ένα ζήτημα μελέτης στον τομέα των μεταγγίσεων ενώ παράλληλα η εύρεση και η εφαρμογή νέων τεχνολογιών αποθήκευσης προς βελτίωση της ποιότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (1).

Η αλλοίωση της ποιότητας των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση πριν την μετάγγιση περιλαμβάνει πολλών ειδών αλλαγές. Οι αλλοιώσεις αυτές οδηγούν τα ερυθροκύτταρα σε αιμόλυση (με επακόλουθη αύξηση του ελεύθερου σιδήρου, της αίμης και της αιμογλοβίνης και μείωση του νιτρικού οξυγόνου), παρατηρούνται: 1) αλλαγές στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων, 2) αύξηση στη συσσώρευση του γαλακτικού οξέως, του ασβεστίου και του καλίου, μείωση του pH και του ρυθμού της γλυκόλυσης και συσσώρευση πρωτεϊνών, λιπιδίων και των μικροκυστιδίων που φέρουν την υπογραφή προέλευσης από τα ερυθροκύτταρα (microvesicles-MVs). Τα επίπεδα των παραπάνω πρωτεϊνών και οι υπόλοιπες βιοχημικές ενδείξεις κατατάσσουν τις μονάδες ερυθροκυττάρων σε νεαρά (21 ημερών).

Η συσσώρευση αυτών των βιοενεργών λιπιδίων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων αποτελεί την κύρια πηγή διατάραξης των ευάλωτων κυτταρικών πληθυσμών. Συγκεκριμένα μια έρευνα μεταβολομικής έδειξε μεγάλη συσσώρευση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αλλά και των οξειδωμένων προϊόντων τους σε ερυθροκύτταρα που είχαν αποθηκευτεί έως και 42 μέρες. Τα μικροκυστιδία με τη σειρά τους δημιουργούνται στους ασκούς των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων λόγω των μεταβολών και της

ασυμμετρίας που δημιουργείται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα μικροκυστίδια υπάρχουν φυσιολογικά και σταθερά στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ η δημιουργία τους συμβαίνει παράλληλα με την αποπτωτική διαδικασία διαφορετικών κυττάρων. Επιπρόσθετες μελέτες έχουν αποσαφηνίσει διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στο σχηματισμό των μικροκυστιδίων από διάφορους αγωνιστές είτε σε φυσιολογικές είτε σε παθολογικές καταστάσεις. Μερικοί από τους παράγοντες που επάγουν τη δημιουργία των μικροκυστιδίων είναι το οξειδωτικό στρες, η διατημημική τάση των ερυθροκυττάρων (λόγω της περικλείση τους στον ασκό) που συνήθως επάγει την παραγωγή ATP, τα επίπεδα του ασβεστίου, οι προ-αποπτωτικοί παράγοντες καθώς και οι αντιπηκτικοί παράγοντες. Επιπρόσθετα, τη δημιουργία των μικροκυστιδίων επηρεάζουν ο χρόνος αποθήκευσης, η ηλικία του δότη και το φύλο του, για παράδειγμα οι μονάδες αίματος από θηλυκούς δότες είναι πιο επιρρεπείς στη δημιουργία των μικροκυστιδίων (3)(21)(22).

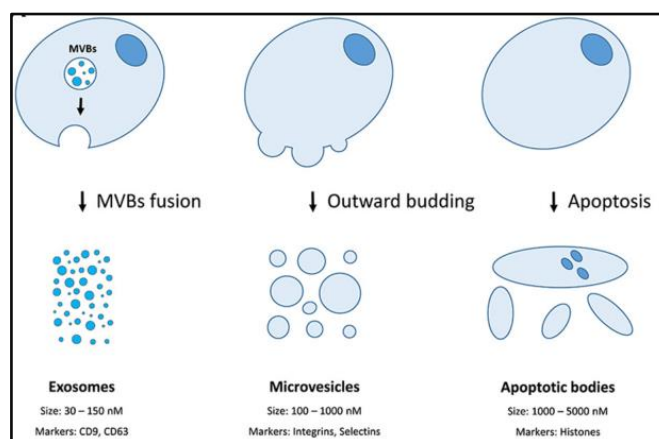
ΔΕΚ (Δικτυοερυθροκύτταρα): Νεαρά RBC τα οποία δεν έχουν πυρήνα αλλά υπολείμματα ριβοσωμιακού RNA. Ζουν 1 ή 2 μέρες σε stress.

1.5.2 Αιμοπετάλια

Η μετάγγιση των αιμοπεταλίων (Platelets-PLTs) αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση για την θρομβοκυτταροπενία που μπορεί να προκαλέσει μεγάλη αιμορραγία και προκύπτει από χημειοθεραπείες ή από σύνδρομα απώλειας του μυελού των οστών ή κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης. Ωστόσο το κόστος της μετάγγισης αιμοπεταλίων είναι αρκετά υψηλό και λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους δεν μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα οπότε δεν είναι εύκολη η μετάγγιση φρέσκων αιμοπεταλίων (23,24). Επιπλέον, δεδομένα προηγούμενων ετών έδειξαν ότι η χρήση αιμοπεταλίων αυξάνεται συνεχώς για διάφορους λόγους με τον σημαντικότερο να είναι η γήρανση του πληθυσμού η οποία συνεπάγεται αύξηση του επιπολασμού των κακοηθειών, καθώς και το γεγονός ότι υπάρχει αυξημένη χρήση αντι-αιμοπεταλιακών παραγόντων σε καρδιακές παθήσεις. Φαίνεται λοιπόν ότι το ποσοστό του πληθυσμού που χρειάζεται ή που θα χρειαστεί αιμοπετάλια για μετάγγιση είναι πιθανό να αυξηθεί τις επόμενες δεκαετίες, ενώ το ποσοστό των δωρητών αιμοπεταλίων είναι πιθανό να μειωθεί δεδομένου ότι η Ελλάδα πολύ συχνά δεν μπορεί να καλύψει την υψηλή εθνική ζήτηση. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι ανάγκες για αιμοπετάλια στα νοσοκομεία της Αθήνας είναι 7505 (6646 αιμοπετάλια τυχαίου δότη (Random donor platelets RDPs) and 859 απλού δότη (SingleDonorPlatelets) (25).

1.6 Τα εξωκυτταρικά κυστίδια

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular Vesicles-EV) είναι σφαιροειδείς δομές που διαθέτουν λιπιδική διπλοστοιβάδα και απελευθερώνονται από τα κάθε είδους κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων ή με διάχυση. Αυτά τα εξωκυτταρικά κυστίδια έχουν προκύψει εξελικτικά από τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτά τα εξωκυτταρικά κυστίδια διαχωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες κυρίως βάσει μεγέθους αλλά και με το μονοπάτι της βιογένεσής τους, τα μικροκυστίδια τα οποία έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από ~100 nm σε 1 μm, τα εξωσώματα (exosomes) με μήκος μεταξύ ~30 το 150 nm και τα αποπτωτικά σωματίδια με μέγεθος 1000-5000nm (εικόνα 4). Ο λειτουργικός τους ρόλος εμπλέκεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς σηματοδότησης της κυτταρικής μεμβράνης όπως η γήρανση, η απόπτωση ή/και η ενεργοποίηση μετά από κάποιο ερέθισμα.



Εικόνα 4. Οι 3 κατηγορίες εξωκυτταρικών κυστιδίων (26)

Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα εξωκυτταρικά κυστίδια εμπλέκονται στις αναπτυξιακές λειτουργίες όπως 1) στην ωρίμανση των ερυθροκυττάρων, 2) στην απομάκρυνση των μη λειτουργικών και επιβλαβών σηματοδοτικών μορίων 3) στην αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης για αποφυγή κυτταρικού θανάτου και επιπλέον 4) διακυτταρική επικοινωνία και μεταφορά βιομορίων και σημάτων μεταξύ κυττάρων και ιστών (3,27).

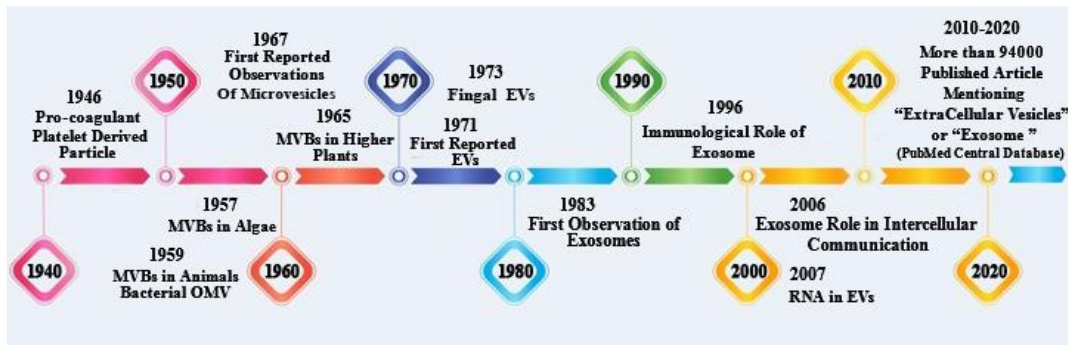
Η πρώτη καταγραφή των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) παρατηρήθηκε το 1946 ως προ-πηκτικά σωματίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια στο φυσιολογικό πλάσμα και 20 χρόνια αργότερα το 1967 αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως σκόνη αιμοπεταλίων (platelet dust) (εικόνα 2). Από τότε και έπειτα η λειτουργία αυτών των μοναδικών σωματιδίων συγκέντρωσε ένα ενδιαφέρον μελέτης κυρίως στις μελέτες αιματολογίας. Στο τέλος

του 20ου αιώνα άρχισαν να εδραιώνονται κάποιες από τις λειτουργίες τους όπως η αντιγονοπαρουσιαστικά (28).

Τα εξωκυττάρια κυστίδια, όπως τα γνωρίζουμε σήμερα, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία, την κυτταρική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των οργάνων. Αξίζει όμως να αναφερθεί πως τα κυστίδια αυτά τράβηξαν το ενδιαφέρον των ερευνητών, αρχικά, κατά την ανάλυση κυτταρικών σειρών με κυτταρομετρία ροής. Για πολλούς ερευνητές τα εξωκυττάρια κυστίδια θεωρήθηκαν πως ήταν αποπτωτικά κύτταρα, παρόλα αυτά, τα αποπτωτικά κύτταρα είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερα και περιέχουν θραύσματα κυττάρων εξαιτίας της αποσύνθεσης των κυττάρων από την πρωτεολυτική δράση της κασπάσης 3, και μπορεί να περιέχουν θραύσματα του πυρήνα, πυρηνικό DNA και ιστόνες (29).

Πρόσφατα, ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη όσον αφορά το μέγεθος, την πυκνότητα ακόμα και τους μηχανισμούς βιογένεσης μεταξύ των κατηγοριών των εξωκυττάρων σωματιδίων, έτσι όμως προκύπτουν προκλήσεις στο διαχωρισμό τους και κυρίως προκύπτουν ερωτήματα για τις *in vivo* λειτουργίες που τους έχουν αποδοθεί (27).

Αν όμως ανατρέξουμε στο παρελθόν, αυτές οι μικρές σφαιρικές μεμβρανικές κύστες φάνηκε να απελευθερώνονται αρχικά από ώριμα δικτυοερυθροκύτταρα, τα ανώριμα ερυθροκύτταρα δηλαδή, και αιμοπετάλια και μετέπειτα από όλους τους τύπους των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κακοήθων αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην περίπτωση των δικτυοερυθροκυττάρων, ο σχηματισμός των εξωκυττάρων κυστιδίων φάνηκε να είναι ένας μηχανισμός απόρριψης της κυτταρικής μεμβράνης και επιφανειακών υποδοχέων που δεν χρειάζεται πια το κύτταρο μετά την ωρίμανσή του σε ερυθροκύτταρο, μια διαδικασία που απαιτεί τη συρρίκνωση του κυτταρικού μεγέθους. Στα αιμοπετάλια, τα εξωκυττάρια κυστίδια που προέρχονται από αυτά, προάγουν την πήξη του αίματος καθώς στην επιφάνειά τους βρίσκονται παράγοντες του πηκτικού μηχανισμού. Ταυτόχρονα εξωκυττάρια μικροκυστίδια φαίνεται να απελευθερώνονται από τα λεμφοκύτταρα, ως αντιγονοπαρουσιαστικά κυστίδια. Οι παρατηρήσεις αυτές συνέβαλαν στο να εδραιωθεί η παρουσία των μικροκυστιδίων σε βαθμό που δεν μπορούσαν πια να θεωρηθούν artifacts (29).



Εικόνα 5. Το χρονοδιάγραμμα απεικονίζει βασικές ανακαλύψεις στην ιστορία της ανακάλυψης και της έρευνας εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs).

Τα μικροκυστιδία (ή όπως αλλιώς χαρακτηρίζονται εκτοσώματα-ectosomes) αντιπροσωπεύουν τον βασικό τύπο εξωκυτταρικών κυστιδίων που σχηματίζονται από την πλασματική μεμβράνη ως εκβλαστήματα. Τυπικά, είναι μεγαλύτερα από τα εξωσώματα αλλά μικρότερα από τα αποπτωτικά κυστίδια αν και μερικές φορές οι διαφορές στο μέγεθος τους δεν είναι σημαντικές.

Η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων από τα κύτταρα είναι ένα μέσο για την απόρριψη περιττών, κατεστραμμένων ή επικίνδυνων υλικών, για την αποκατάσταση βλαβών της μεμβράνης αλλά και για τη διακυτταρική επικοινωνία. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα τα μικροκυστιδία επηρεάζουν και συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών και κατά συνέπεια, οι αλλαγές στη συγκέντρωση ή στα συστατικά τους έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθολογίες.

Όλο και περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στη λειτουργία των μικροκυστιδίων στα κύτταρα του αίματος και πως αυτά μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα και τη λειτουργία των κυττάρων αυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μικροκυστιδία που απελευθερώνονται από τα παράγωγα του αίματος όπως τα λευκοκύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των μικροκυστιδίων του πλάσματος και διαφοροποιούνται σε διάφορες παθολογίες όπως του αιματολογικού συστήματος αλλά και του νευρικού, του καρδιαγγειακού ή και ουροποιητικού συστήματος. Πρόσφατα δεδομένα συνηγορούν ότι τα μικροκυστιδία που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του αίματος εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις αναστέλλοντας ή ενεργοποιώντας φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές αντιδράσεις αλλά και ανωμαλίες στη δράση των πεπτικών παραγόντων. Από την άλλη, έχει βρεθεί ότι τα μικροκυστιδία μπορούν να έχουν και κυτταροπροστατευτικό ρόλο. Με βάση αυτές τις ποικιλότροπες λειτουργίες, τα μικροκυστιδία μπορεί να αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους διαγνωστικούς βιοδείκτες ασθενειών (27).

1.6.1 Μικροκυστίδια στα κύτταρα του αίματος

Η πλειοψηφία των εξωκυτταρικών κυστιδίων στο περιφερικό αίμα προέρχεται από τα αιμοπετάλια και ίσως αυτός να είναι ο λόγος που παρατηρήθηκαν πρώτα αυτά τα εξωκυτταρικά κυστίδια και αναφέρθηκαν αρχικά στη βιβλιογραφία ως η σκόνη των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια ακολούθησαν μελέτες που περιέγραψαν εκτενέστερα τα χαρακτηριστικά των εξωκυτταρικών κυστιδίων των αιμοπεταλίων ενώ άλλες επιπρόσθετες μελέτες περιέγραψαν λεπτομερώς τη δημιουργία των κυστιδίων αυτών, τα συστατικά τους, καθώς και τις πηκτικές τους ιδιότητες αλλά και τις προτιμήσεις των EVs να αλληλεπιδρούν με τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα (30,31).

Οι έρευνες σχετικά με τη λειτουργία των EVs στο πλάσμα αποκάλυψαν την αφθονία των EVs που προέρχονται από τα αιμοπετάλια καθώς και από τα ερυθροκύτταρα, αλλά και την επίδραση προαναλυτικών παραγόντων όπως ο χρόνος αποθήκευσης του δείγματος αίματος, η θερμοκρασία και τα αντιπηκτικά στην έκκρισή τους (28,32,33). Το κύριο σήμα για το σχηματισμό των EVs των ερυθροκυττάρων είναι η ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος, που έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση σωματιδίων της μεμβράνης και συμβάλλει στο μειωμένο μέγεθος και στη διακριτή σύνθεση πρωτεϊνών της μεμβράνης παλαιότερων ερυθροκυττάρων, όπως καταδεικνύεται στο (34).

1.7 Οι μηχανισμοί δημιουργίας των εξωκυτταρικών κυστιδίων κατά την αποθήκευση των παραγώγων του αίματος

Η αύξηση του απόλυτου αριθμού του συνόλου των εξωκυττάρων κυστιδίων ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης έχει κυρίως αποδοθεί στα κυστίδια που προέρχονται από τα ερυθρά και τα αιμοπετάλια τα οποία φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης κατά τη διάρκεια της φύλαξης. Επίσης όλες οι μονάδες αίματος περιέχουν υπολείμματα πλάσματος με μικροκυστίδια και αποπτωτικά κυστίδια που έχουν δημιουργηθεί in vivo από τα κύτταρα του δότη (5). Η λευκαφαίρεση στα παράγωγα του αίματος πριν την αποθήκευσή τους, μειώνει τη δημιουργία εξωκυττάρων κυστιδίων κατά τη συντήρησή τους, παρόλο που δεν αφαιρεί πλήρως τα κυστίδια που υπήρχαν στην κυκλοφορία του δότη. Στις μονάδες όπου δεν έχει γίνει λευκαφαίρεση, τα λευκά αιμοσφαίρια που συσσωρεύονται και τα αιμοπετάλια εκκρίνουν κυστίδια, προάγοντας έτσι τις ιδιότητες της αποθήκευσής τους (5).

Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την *ex vivo* αποθήκευση του ολικού αίματος χάνουν τη μεμβράνη τους απελευθερώνοντας μικροκυστιδία, που αποτελεί ένα γνωστό κυτταρικό μηχανισμό και εμπλέκεται σε μια πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών όπως η αιμόσταση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση και η απόπτωση (8).

Η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξάνεται σε πολλές παθήσεις αιματολογικής φύσεως όπως η κληρονομούμενη αιμολυτική αναιμία και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αλλά και μη αιματολογικής φύσεως όπως η αθηροσκλήρωση, η νόσος του Πάρκινσον και ο διαβήτης τύπου 2 (27). Η συνεχιζόμενη εξάντληση των μορίων ATP κατά την αποθήκευση της μονάδας αίματος οδηγεί σε σταθερή μείωση της δραστηριότητας των καναλιών ασβεστίου Ca^{++} της πλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων εντός των ερυθροκυττάρων. Κατά την παρατεταμένη αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων και εξάντλησης του ATP τα αποθέματα μεταβάλλουν τη δραστηριότητα των βασικών ενζύμων της πλασματικής μεμβράνης που εμπλέκονται στη διατήρησή της. Αποτέλεσμα αυτής της διαταραχής είναι η αυξημένη έκθεση των ανιονικών φωσφολιπιδίων στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, ιδιαίτερα της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), που ακολουθείται από κυστιδιοποίηση και απελευθέρωση των EVs (35).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια εκκρίνουν μικροκυστιδία ενώ βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και η διαδικασία αυτή εντείνεται λόγω φυσιολογικής γήρανσης, υπό οξειδωτικό στρες ή ερυθρόπτωση. Το μέγεθος των μικροκυστιδίων που εκκρίνονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπολογίζεται περίπου στα 150nm. Η παρουσία τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία έχει συσχετιστεί με μειωμένο σχηματισμό θρομβίνης που τους προσδίδει αντιπηκτικό ρόλο (27).

Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί και τα μονοπάτια σηματοδότησης που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό και την απελευθέρωση των EVs που προέρχονται από τα RBC δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστά. Ως άμεσο αποτέλεσμα του συνεχούς σχηματισμού EVs, εκτός από τη σταδιακή μείωση του μεγέθους των RBCs, τόσο τα αποθηκευμένα RBCs όσο και τα EVs που προέρχονται από RBCs, εμφανίζουν αυξανόμενα επίπεδα PS στην επιφάνειά τους. Είναι σημαντικό ότι πρόσφατες μελέτες άρχισαν να ρίχνουν φως στις βιολογικές δραστηριότητες των EVs, εμπλέκοντάς τις, στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης ρυθμίζοντας τη φλεγμονώδη απόκριση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων μετά τη φαγοκυττάρωση, καθώς και στην προώθηση της θρόμβωσης.

Αιμοπετάλια

Η πλειονότητα των μικροκυστιδίων που βρίσκονται στο πλάσμα προέρχεται από τα αιμοπετάλια. Ο ρόλος που διαδραματίζουν τα αιμοπετάλια στον αιμοστατικό μηχανισμό αποδίδεται κυρίως στην έκθεση στη φωσφατιδυλοσερίνη, παρόλο που ο ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF) στην επιφάνειά τους μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει το εξωγενές μονοπάτι της πήξης (27). Τα μικροκυτίδια που προέρχονται από τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στη διακυτταρική επικοινωνία και επηρεάζουν αρκετές βιολογικές διαδικασίες. Έχουν βρεθεί, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε όσα βιολογικά υλικά έχουν διερευνηθεί μέχρι στιγμής συμπεριλαμβανομένων του πλάσματος, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, των ούρων, του σπέρματος, του σάλιου και του μητρικού γάλακτος (29).

Σε παθολογικές καταστάσεις ο αριθμός των μικροκυστιδίων αυξάνεται στα βιολογικά υλικά (29). Στις αιματολογικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από αιμορραγική προδιάθεση, όπως το σύνδρομο Scott και συγκεκριμένα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, τα αιμοπετάλια εμφανίζουν χαμηλούς ρυθμούς κυστιδιοποίησης. Αντίθετα, θεωρείται ότι τα υψηλά επίπεδα μικροκυστιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια σε παιδιά με αυτοάνοση θρομβοκυτταρική πορφύρα περιορίζουν τη σοβαρή αιμορραγία (27).

Από την άλλη υπάρχει περιορισμένος αριθμός ερευνών σχετικά με τα μονοπάτια προέλευσης των μικροκυστιδίων που προέρχονται από τα αιμοπετάλια και έχουν απομονωθεί από μονάδες αιμοπεταλίων για μετάγγιση. Οι μελέτες αυτές δείχνουν την εμπλοκή τους στο σχηματισμό θρομβίνης κυρίως λόγω της φωσφατιδυλοσερίνης που βρίσκεται στην επιφάνειά τους (27).

Λευκοκύτταρα

Τα μικροκυτίδια που προέρχονται από λευκά αιμοσφαίρια εκφράζουν κυτταροπλασματικούς και μεμβρανικούς δείκτες, ανάλογα το κύτταρο από το οποίο προήλθαν, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, βιοενεργών λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων. Τα μικροκυτίδια με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια της επιφάνειάς τους που συμμετέχουν στον πηκτικό μηχανισμό μπορούν να επηρεάσουν την αιμόσταση. Επίσης αλληλεπιδρούν με τη φυσική και επίκτητη ανοσία μεταδίδοντας προ-φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες τόσο στις μολυσματικές όσο και στις μη μολυσματικές ασθένειες και στις λοιμώξεις. Η συσσώρευσή τους στο αίμα ως αποτέλεσμα κυτταρικής διέγερσης και η έκφραση εξειδικευμένων για την ασθένεια δεικτών τα καθιστά σαν πιθανούς προγνωστικούς δείκτες ή δείκτες παρακολούθησης νόσου (disease monitoring) σε ασθένειες όπως η πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση, το

σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, η αθηροσκλήρωση, η οξεία μυελογενής λευχαιμία και το σηπτικό σοκ (27).

1.8 Οι λειτουργικές αλλοιώσεις των παραγώγων του αίματος από τον σχηματισμό των EVs κατά την αποθήκευση

Τα μικροκυτίδια που προέρχονται από τα ερυθρά όταν αυτά συντηρούνται προς μετάγγιση εμφανίζουν κάποια ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Αρχικά, συσσωρεύονται με εκθετικό βαθμό στο υπερκείμενο των μονάδων των ερυθρών κατά τη φύλαξή τους και η σύνθεσή τους φαίνεται να ακολουθεί το *in vitro* μοντέλο γήρανσης των ερυθρών, ενώ τα χαρακτηριστικά αυτά διαφοροποιούνται από τις συνθήκες φύλαξης, όπως για παράδειγμα το συντηρητικό που χρησιμοποιείται. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από αυξημένη ινωδολυτική δράση λόγω της παρουσίας του πλασμινογόνου στην επιφάνειά τους, αλλά και από αντιθρομβωτική δραστηριότητα που σχετίζεται με την παρουσία της α2-μακρογλοβίνης (27). Συγκεκριμένα τα EVs που προέρχονται από τα RBCs είναι εμπλουτισμένα σε 1) διακυλογλυκερόλη (DAG), 2) χοληστερόλη, 3) CR1 (υποδοχέας συμπληρώματος 1, CD35) και 4) πρωτεΐνες αγκυρωμένες στο glycosylphosphatidylinositol (GPI) όπως CD55, CD59 και ακετυλοχολινεστεράση σε σύγκριση με τη σχετική κατανομή των παραπάνω λιπιδίων τους στη πλασματική μεμβράνη των RBCs (35).

Αξίζει να σημειωθεί ότι μια πληθώρα πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, όπως η γλυκοφορίνη A (GPA) εντοπίζονται στα EVs σε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με την πλασματική μεμβράνη των RBCs, υποδηλώνοντας έντονα ότι η κυστιδιοποίηση της πλασματικής μεμβράνης δεν είναι μια τυχαία διαδικασία. Η γλυκοφορίνη A είναι γλυκοπρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, προσδίδοντας τους ένα υδροφιλικό κάλυμα και δίνοντας τους έτσι τη δυνατότητα να σχηματίσουν κυκλικές δομές χωρίς να αλληλεπιδράσουν με άλλα κύτταρα ή με τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων. Η γλυκοφορίνη A συγκεκριμένα είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των αντιγόνων MN και Ss των διαφορετικών ομάδων αίματος.

Ο σχηματισμός των EVs έχει ως αποτέλεσμα μια σταδιακή και σημαντική απώλεια ρυθμιστικών σωματιδίων του συμπληρώματος όπως είναι τα CR1, CD55 και CD59 από τα αποθηκευμένα RBCs.

Ο οψωνισμός (*opsonization*) είναι η επαγωγή της φαγοκυττάρωσης του αντιγόνου από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Οι υποδοχείς Fc (FcR), στην επιφάνεια των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων αλληλεπιδρούν με το Fc θραύσμα των ανοσοσφαιρινών ώστε το παθολόγο να αναγνωρισθεί ως στόχος αποδόμησης οποία περιλαμβάνει ενζυμική διάσπαση, οξειδωτική καταστροφή και επιδράσεις αντιμικροβιακών πεπτιδίων στη διάσπαση μεμβρανών (Casadevall, Dadachova et al. 2004).

Εκτός από τη σταδιακή απώλεια της ρυθμιστικής λειτουργίας των πρωτεϊνών του συμπληρώματος των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, η απώλεια του CR1 οδηγεί σε σταθερή μείωση της ικανότητας των αποθηκευμένων RBC να δεσμεύουν και να καθαρίζουν σωματίδια που προορίζονται για φαγοκυττάρωση μετά από ενεργοποίηση του συμπληρώματος (*complement-opsonized particles*). Αυτή η εκκαθάριση των προϊόντων της ανοσολογικής εκκαθάρισης εξελίχθηκε ως αποτελεσματικό μέσο σύνδεσης και αφαίρεσης φλεγμονωδών σωματιδίων από τον ενδοαγγειακό χώρο, μια διαδικασία κρίσιμη για την πρόληψη της ενεργοποίησης των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και του αγγειακού ενδοθηλίου.

Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα αιμοπετάλια είναι σε μεγαλύτερη αφθονία στην κυκλοφορία του αίματος, προάγουν τις διαδικασίες της πήξης και της φλεγμονής και ρυθμίζουν την ανοσιακή απόκριση (36).

Η συγκέντρωση των μικροκυστιδίων στο υπερκείμενο των μονάδων των ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξάνεται περισσότερο από 18-20 φορές όσο πλησιάζουμε στη ημερομηνία λήξης των ασκών συγκριτικά με τα επίπεδα που έχουν μετρηθεί τις πρώτες 5 μέρες με κυτταρομετρία ροής τόσο σε λευκαφαιρεμένους όσο και σε μη λευκαφαιρεμένους ασκούς (5).

Εκτός από τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια, άλλα αιμοσφαίρια παράγουν επίσης EVs. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα όπως τα μαστοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα εκκρίνουν EVs, αλλά αυτές οι αναφορές προέρχονται από πειράματα *in vitro* και δεν επαληθεύουν την παρουσία EVs από αυτούς τους κυτταρικούς τύπους που κυκλοφορούν. Στην περίπτωση των βασεόφιλων, από ό,τι γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν ενδείξεις έκκρισης EVs. Υπό κανονικές συνθήκες, υπάρχουν λίγα βασεόφιλα που κυκλοφορούν στο αίμα και όταν ενεργοποιηθούν, εκκρίνουν το περιεχόμενο της μεγάλης ποσότητας κόκκων που φέρουν, απελευθερώνοντας το εσωτερικό περιεχόμενο, αλλά δεν παράγουν EVs (28).

1.8.1 Εξωκυτταρικά Μικροκυτίδια (EVs) που παράγονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια της κυκλοφορίας από το συμπλήρωμα

Το σύστημα συμπληρώματος αποτελείται από περισσότερες από 20 διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες ρυθμίζοντας την αναγνώριση, τη δέσμευση και την απομάκρυνση ξένων σωματιδίων καθώς και την έναρξη και τη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να συμβεί μέσω οποιασδήποτε από τις κλασικές ή εναλλακτικές οδούς περιλαμβάνει τον ομοολιγομερισμό και την εισαγωγή του συμπλέγματος επίθεσης μεμβράνης (Membrane Attack Complex, MAC) στην μεμβράνη πλάσματος. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε μια μη ρυθμισμένη εισροή νερού και Ca^{++} που ακολουθείται από λύση και θάνατο των κυττάρων. Το αποτέλεσμα της εξωκυττάρωσης που προκαλείται από το MAC είναι ο σχηματισμός και η απελευθέρωση στην κυκλοφορία των EVs, τα οποία περιέχουν, εκτός από τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια του συμπληρώματος όπως CD46, CR1, CD55 και CD59, και συστατικά του συμπλέγματος MAC.

Τα κυκλοφορούντα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να αφαιρέσουν τα MAC από την πλασματική μεμβράνη με κυστιδοποίηση με αποτέλεσμα το σχηματισμό των EVs με αυτό το μηχανισμό να απαιτεί κυρίως Ca^{++} . Ως αποτέλεσμα του σχηματισμού των EVs κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής των κυκλοφορούντων RBCs (~120 μέρες), το μέγεθος και η πρωτεϊνική σύνθεση των RBC ποικίλλει μεταξύ των κυκλοφορούντων RBCs, με τα νέα RBCs να είναι μεγαλύτερα και να έχουν ένα πλήρες συμπλήρωμα πρωτεϊνών μεμβράνης ενώ τα παλιά RBCs να φαίνονται μικρότερα και πυκνότερα με σημαντικά λιγότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος προκαλούν τον σχηματισμό μικρών (160-180 nm) κυστιδίων που εκβλάστησαν από την πλασματική μεμβράνη, χωρίς κυτταρική λύση. Βάσει των παραπάνω δεδομένων δεικνύεται ότι EVs είναι ποικίλης κυτταρικής προέλευσης με πολύ διαφορετικές συνθέσεις τα οποία βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα κυκλοφορούντα EVs έχουν χρόνο ημιζωής 5-10 λεπτά και αφαιρούνται από τα μακροφάγα σε διαφορετικούς ιστούς, πνεύμονες, ήπαρ και σπλήνα (35).

Παρόλο που τα χαρακτηριστικά των μικροκυστιδίων που προέρχονται από τα λευκά αιμοσφαίρια δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς υπό συνθήκες φύλαξης αλλά ούτε και η επίδρασή τους μετά τη μετάγγιση, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων τους, ειδικά σε μονάδες που δεν έχει γίνει λευκαφαίρεση, κατά τη συντήρησή τους (27).

Κεφάλαιο 2. Αποτελέσματα

Σύμφωνα με την έρευνα των Bicalho και συνεργάτες, βρέθηκε ότι, η κυστιδιοποίηση κατά την αποθήκευση των συμπυκνωμένων ερυθρών επηρεάζεται από το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένος ο ασκός κατά τις πρώτες 3 εβδομάδες της αποθήκευσης, ενώ για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα της φύλαξης δε φάνηκε να παίζει κάποιο ρόλο το υλικό του ασκού. Αντικείμενο της μελέτης τους αποτέλεσε αν και κατά πόσο το υλικό των ασκών επηρεάζει την ποιότητα του μεταγγιζόμενου προϊόντος. Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα από εθελοντές. Μετά από λευκαφαίρεση τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 είδη ασκών: 1) PVC/DEHP, 2) PVC/DINCH και 3) PVC/BTHC. Την 5η ημέρα η συγκέντρωση των EVs κυμάνθηκε από 5×10^9 έως 9×10^9 EVs/l, όπου η χαμηλότερη τιμή αναφέρεται στους ασκούς από DEHP και η υψηλότερη στους ασκούς με n-butyltri-n-hexyl citrate (BTHC). Βρέθηκε ότι, η κυστιδιοποίηση κατά την αποθήκευση των συμπυκνωμένων ερυθρών επηρεάζεται από το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένος ο ασκός κατά τις πρώτες 3 εβδομάδες της αποθήκευσης, ενώ για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα της φύλαξης δε φάνηκε να παίζει κάποιο ρόλο το υλικό του ασκού. Την 21η μέρα η συγκέντρωση των RBC EVs σχεδόν διπλασιάστηκε στους ασκούς με DINCH και DEHP, ενώ σχεδόν τριπλασιάστηκε σε αυτούς με BTHC. Στο διάστημα μεταξύ της 21ης και της 35ης ημέρας συντήρησης τα εξωκυττάρια κυστίδια τριπλασιάστηκαν ανεξαρτήτως υλικού και από την 35η έως την 42η παρατηρήθηκε διπλασιασμός. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους των εξωκυττάρων κυστιδίων, κατά 200nm, από την 5η έως την 42η ημέρα, ανεξαρτήτως υλικού, υποδηλώνοντας ότι στα συμπυκνωμένα ερυθρά υπάρχουν τόσο εξωσώματα όσο και μικροκυστίδια (37).

Σύμφωνα με την έρευνα των Sugawara και συνεργάτες η λευκαφαίρεση του ολικού αίματος πριν την αποθήκευση φάνηκε να μειώνει τα PMPs. Για τη διεξαγωγή της μελέτης λήφθηκαν 5 δείγματα ανδρών και 5 δείγματα γυναικών, με μέσο όρο ηλικίας τα 36 έτη. Με εξαίρεση ένα δείγμα, σε όσα δείγματα διενεργήθηκε λευκαφαίρεση τα events των PMPs που ανιχνεύθηκαν ήταν σταθερά κάτω από 100/μl κατά τις 35 ημέρες αποθήκευσης, σε αντίθεση με τα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα όπου τα events των PMPs αυξήθηκαν πάρα πολύ από την 7η κιόλας μέρα (36,38).

Σύμφωνα με την έρευνα των Nomura και συνεργάτες, όπου μελετήθηκαν ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μετάγγιση με αιμοπετάλια σε διάστημα περίπου 3,5 ετών. Από τα 203 περιστατικά μεταγγίσεων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, 137 ασθενείς εμφάνισαν κάποια παρενέργεια. Από τους 137 ασθενείς, το ποσοστό των ασθενών με κάποια αιματολογική ασθένεια ήταν μεγαλύτερο από εκείνους που δεν είχαν κάποια ασθένεια αιματολογικής

φύσεως. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες που να σχετίζεται με κάποια παρενέργεια. Ωστόσο, τα επίπεδα μικροκυστιδίων ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με ασθένεια αιματολογικής φύσεως και σημαντικά μειωμένα μετά τη λευκαφαίρεση (39)

Σύμφωνα με την έρευνα των Gao και συνεργάτες, ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων επηρεάστηκε από τη διαδικασία της αιμοπεταλιαφαίρεσης, προκαλώντας το σχηματισμό των μικροκυστιδίων *ex vivo*. Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα 16 υγιών ανδρών, που δώρισαν τα αιμοπετάλιά τους. Πριν τη συλλογή των δειγμάτων, επιλέχθηκαν τυχαία 8 δείγματα για λευκαφαίρεση. Τα επίπεδα των PDMPs ήταν σημαντικά αυξημένα στα δείγματα που συλλέχθηκαν με αιμοπεταλιαφαίρεση και ήταν συσσωρευμένα κατά την αποθήκευση αυτών των προϊόντων. Η λευκαφαίρεση δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τον πληθυσμό των μικροκυστιδίων (40). Τα αποτελέσματα προγενέστερης μελέτης της ομάδας αυτής έδειξαν ότι ο σχηματισμός μικροκυστιδίων λόγω αποθήκευσης των ερυθρών μπορεί να προάγει την πήξη. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει τόσο λόγω της έκθεσης φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των MPs αλλά και με την ενεργοποίηση του σχηματισμού θρομβίνης, ανεξάρτητα από τον ιστικό παράγοντα (tissue factor, TF). Για τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης λήφθηκαν συμπυκνωμένα ερυθρά από 6 υγιείς δότες. Η ποσότητα των MPs μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής σε 7 χρονικά διαστήματα: d0, d7, d14, d21, d28, d35 και d42. Η συγκέντρωση των MPs βρέθηκε 18 φορές πιο αυξημένη μετά από 42 ημέρες συντήρηση στους 4oC σε σχέση με τη μέρα 0 (8).

Η έρευνα των Saito και συνεργατών έδειξε ότι η λευκαφαίρεση των μονάδων πριν τη συντήρησή τους μπορεί να αποτρέψει το σχηματισμό WBC-MPs και PMPs. Για διενέργεια αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 9 υγιών ανδρών, που πληρούσαν τα κριτήρια αιμοδοσίας. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες ανάλογα με την επεξεργασία τους, 1) λευκαφαιρεμένα χωρίς ακτινοβολήση, 2) λευκαφαιρεμένα με ακτινοβολήση, 3) χωρίς λευκαφαίρεση και χωρίς ακτινοβολήση, 4) χωρίς λευκαφαίρεση ακτινοβολημένα. Οι μετρήσεις έγιναν κατά τις ημέρες 0 (λήψη), 1, 7, 14, 21, 28, 35 και 42 κατά τη φύλαξη. Τα PMPs και τα WBC-MPs ήταν σημαντικά αυξημένα στα μη λευκαφαιρεμένα προϊόντα, είτε αυτά είχαν ακτινοβοληθεί είτε όχι, σε σχέση με τα λευκαφαιρεμένα προϊόντα. Η ποσότητα των RMPs δε φάνηκε να επηρεάζεται είτε από τη λευκαφαίρεση είτε από την ακτινοβολήση (41)

Αντίθετα σύμφωνα με μεταγενέστερη έρευνα των Nollet και συνεργατών δε φάνηκε να υπάρχει διαφορά στο σχηματισμό των MPs που να σχετίζεται με το φιλτράρισμα των αιμοπεταλίων. Αντικείμενο αυτής της μελέτης ήταν αφαιρεμένα αιμοπετάλια (apheresis

plts) από ζεύγη ανδρών με πανομοιότυπο σύστημα ABO που δεν λάμβαναν κάποια αγωγή που να επηρέαζε τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τα δείγματά τους χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες, αυτά χωρίς κάποιο φιλτράρισμα και αυτά που φιλτραρίστηκαν με 3 διαφορετικές συσκευές. Οι μετρήσεις έγιναν κατά τις ημέρες 0 (λήψη), 1, 3, 5, 7 και 14. Παρόλο που ευρήματα μετά το όριο φύλαξης για μετάγγιση δε θεωρούνται κλινικά σημαντικά, συμπεριλήφθηκαν στην περίπτωση που αναδείξουν αποτελέσματα που ίσως περνούσαν απαρατήρητα υπό άλλες συνθήκες (42).

Κεφάλαιο 3. Συζήτηση

Η αποτελεσματικότητα της μετάγγισης των RBCs είναι αρκετά δύσκολο να αξιολογηθεί επειδή αυτή η θεραπεία εισήχθη πριν από την επίσημη καθιέρωση της ιατρικής που βασίζεται σε στοιχεία. Η μετάγγιση θεωρείται σχεδόν ομόφωνα μια σωτήρια διαδικασία ωστόσο θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι, σε σπάνιες περιπτώσεις, η μετάγγιση μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες και να βλάψει ή ακόμα και να σκοτώσει τον λήπτη. Οι μεταγγίσεις αποτελούν ρουτίνα στην καθημερινή κλινική πράξη, σε βαθμό που δεν λαμβάνεται υπόψη πως αποτελεί μεταμόσχευση οργάνου με κινδύνους και πολυπλοκότητα, ανεξάρτητα από το ότι στερείται τις ενδείξεις μιας μεταμόσχευσης συμπαγούς οργάνου. Επιπλέον, η αυξανόμενη διαθεσιμότητα εναλλακτικών θεραπειών σημαίνει ότι η μετάγγιση δεν είναι πλέον απλή υπόθεση «ζωής ή θανάτου», αλλά πιο συχνά μια κατάσταση στην οποία η μετάγγιση παρέχει μια πιο αποτελεσματική ή ταχεία θεραπεία. Οι μεταγγίσεις αποτελούν ρουτίνα στην καθημερινή κλινική πράξη, σε βαθμό που δεν λαμβάνεται υπόψη πως αποτελεί μεταμόσχευση οργάνου με κινδύνους και πολυπλοκότητα, ανεξάρτητα από το ότι στερείται τις ενδείξεις μιας μεταμόσχευσης συμπαγούς οργάνου. Οι ειδικοί στην ιατρική των μεταγγίσεων τείνουν να υποστηρίζουν ότι η μετάγγιση είναι ωφέλιμη, ενώ άλλοι γιατροί αμφιβάλλουν για τη διαδικασία και εκφράζουν ανησυχίες σχετικά με τους κινδύνους που συνδέονται με τη μετάγγιση οπότε είναι σημαντικό να κατανοηθεί η ρεαλιστική έννοια της αναλογίας οφέλους-κινδύνου των διαδικασιών μετάγγισης (11,16).

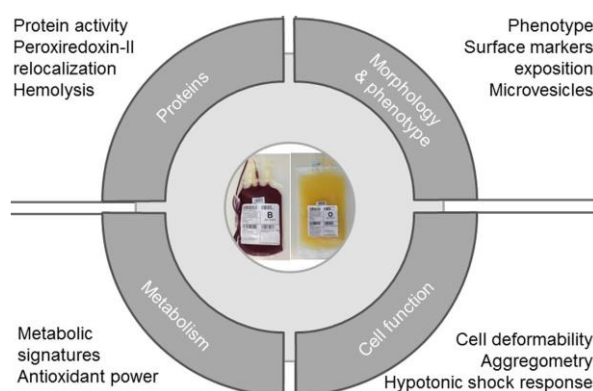
Οι εξελίξεις στον χαρακτηρισμό των συμπτωμένων αιμοπεταλίων και των αιμοσφαιρίων ήταν εντυπωσιακές τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Υπάρχει μια πληθώρα παραμέτρων όπως ο μεταβολισμός, διάφοροι πρωτεϊνικοί δείκτες αλλά και διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Εικ. 1) που μπορούν να αξιολογηθούν ωστόσο υπάρχουν ακόμη πολλοί δείκτες που πρέπει να ανακαλυφθούν ως προς τη ποιότητα και τη γήρανση των κυττάρων του αίματος όπως έχει δείξει πρόσφατα μία έρευνα πρωτεωμικής σε ερυθρά αιμοσφαίρια (11).

Θεωρείται επιτακτική ανάγκη να τεθούν νέοι στόχοι μείωσης των βλαβών αποθήκευσης και να επανεξεταστούν οι μέθοδοι απομόνωσης και αποθήκευσης του αίματος και των παραγώγων του καθώς υπάρχουν νέα δεδομένα τα οποία πρέπει να αξιολογηθούν. Στην αξιολόγηση των νέων δεδομένων σημαντικό ρόλο ίσως επιδείξουν *in vitro* πειραματικά δεδομένα. Ο στόχος θα πρέπει να είναι η μελέτη, εκτός από το συνηθισμένο και ευρέως διαδεδομένο ανώτατο όριο αιμόλυσης ή τον αριθμό των αιμοπεταλίων, της περιδήνησης και του pH των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων.

Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η χρησιμότητα κάθε μιας παραμέτρου που θεωρείται κύρια παράμετρος θα πρέπει να αξιολογείται κριτικά και να επαναξιολογείται σε κάθε μελέτη χωρίς να χρησιμοποιούνται μόνο επειδή έχουν τεθεί από τις υγειονομικές αρχές. Όπως για παράδειγμα η καταγραφή της τιμής του pH, το οποίο θεωρείται δείκτης αποθήκευσης των συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και μετράται σε τράπεζες αίματος σε κάθε δείγμα κατά τη λήξη, ως μέρος ρουτίνας ποιοτικού ελέγχου. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια καταστρέφονται ανεπανόρθωτα όταν το pH πέσει κάτω από 6,. Ωστόσο, η σημασία της μέτρησης της τιμής του pH ως ποιοτικού ελέγχου έχει αμφισβητηθεί (43). Σε μια πολυκεντρική μελέτη που δημοσιεύτηκε για λογαριασμό του the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST), εντοπίστηκαν πολύ λίγες αποτυχίες pH σε οποιοδήποτε από τα κέντρα που συμμετείχαν στη μελέτη, επιβεβαιώνοντας ότι αυτή η μέτρηση είναι ένας κακός δείκτης της ποιότητας των αιμοπεταλίων. Αν και παρατηρήθηκε σημαντική μεταβλητότητα στην κατανομή των τιμών του pH μεταξύ των κέντρων αναφοράς λόγω των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας, είναι ενδιαφέρον ότι τα χαρακτηριστικά του δότη όπως η ηλικία και το φύλο, επηρεάζουν την κατανομή των τιμών του pH, υποδηλώνοντας ότι ορισμένα χαρακτηριστικά του δότη σχετίζονται με κακή αποθήκευση αιμοπεταλίων. Ίσως τα χαρακτηριστικά αυτά καθορίσουν τις με τις μελλοντικές κατευθυντήριες οδηγίες για τον καθορισμό της ποιότητας των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων.

Πιο πρόσφατα, τα miRNAs - σημαντικοί ρυθμιστές των κυτταρικών λειτουργιών - έχουν διερευνηθεί σε αιμοπετάλια που υποβάλλονται ή όχι σε τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων. Η μεταβολή των miRNA των αιμοπεταλίων έχει αναφερθεί κατά τις θεραπείες απενεργοποίησης παθογόνων (44,45). Σε μια μελέτη των Dahiya et al. παρέχονται οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις miRNA-mRNA που υποκρύπτουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια. Χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για να αξιολογηθούν τα microRNA ως πιθανοί δείκτες της ποιότητας των αιμοπεταλίων. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη και η βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας BC θα πρέπει να

λαμβάνει υπόψη τους δείκτες που αντανακλούν τις βλάβες σε διαφορετικά επίπεδα, δηλαδή σε χημικό, βιολογικό και κυτταρικό επίπεδο (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Βασικές παράμετροι των βλαβών αποθήκευσης (11)

Η αιμόλυση είναι ένας ενδεδειγμένος δείκτης, αλλά δεν αντιπροσωπεύει τη λειτουργικότητα των υπόλοιπων «υγιών» ερυθροκυττάρων τα οποία μπορεί να εμφανίσουν παραμόρφωση ή μεταβολικές υπογραφές. Μια τέτοια προσέγγιση συνεπάγεται τη χρήση πολλών αναλυτικών μεθόδων και την τεχνογνωσία σε διαφορετικούς τομείς. Για να αναφέρουμε μερικά: πρωτεωμική σε συνδυασμό με έρευνα βασισμένη στη φασματομετρία μάζας τη μοριακή βιολογία (mRNA, mtDNA), την κυτταρομετρία ροής και λειτουργικές δοκιμασίες και μικροσκοπία. Η στρατηγική θα επιτρέψει την ευρεία απεικόνιση των βλαβών και των συμβάντων αλλοιώσεων. Στη συνέχεια, η διόρθωση αυτών θα καθοδηγείται και θα καθοδηγείται από όλα τα καταγεγραμμένα δεδομένα (11).

Με την πρόοδο του τεχνολογικού εξοπλισμού μπόρεσαν να μελετηθούν μικρότερα σωματίδια στα παράγωγα του αίματος, όπως τα μικροκυστίδια, τα οποία ενώ παλιότερα θεωρούνταν «βρωμιά» (debris) χωρίς κάποια βιολογική λειτουργία, πλέον αποτελούν σωματίδια με βιολογικό ρόλο, όπως η αιμόσταση και η φλεγμονή (46–48). Επίσης έρευνες έχουν ανιχνεύσει συσσωρευμένα MPs στη συντήρηση παραγώγων του αίματος όπως τα συμπυκνωμένα ερυθρά και τα αιμοπετάλια (49–51). Έρευνες έχουν δείξει ότι η κυστιδιοποίηση στα παράγωγα του αίματος αυξάνεται όσο «παλιώνουν» οι ασκοί και κυρίως μετά τις 21 ημέρες αποθήκευσης (37,38). Σημαντικός παράγοντας μείωσης του σχηματισμού των μικροκυστιδίων, σύμφωνα με τις μελέτες των Saito και συνεργατών, Nomura και συνεργατών και Sugarawa και συνεργατών, φάνηκε να αποτελεί η επεξεργασία του ολικού αίματος πριν την αποθήκευση με τη διαδικασία της λευκαφαίρεσης. Αντίθετα σύμφωνα με

τη μελέτη των Nollet και συνεργατών η διαδικασία δε φάνηκε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στο σχηματισμό των MPs (39). Παρόλα αυτά σύμφωνα με τις έρευνες των Bicalho και συνεργατών και των Gao και συνεργατών σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει γενικά η επεξεργασία του ολικού αίματος πριν την αποθήκευση και συντήρησή του (37,40).

Συμπερασματικά, ενώ υπάρχουν έρευνες που ενισχύουν την άποψη ότι η κυστιδιοποίηση επηρεάζεται από το διαχειρισμό του ολικού αίματος, υπάρχουν έρευνες τα ευρήματα των οποίων δε συμβαδίζουν με αυτή την υπόθεση. Δεδομένου όμως ότι η μετάγχιση αποτελεί καθημερινή κλινική πράξη, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της κυστιδιοποίησης και των επιπλοκών που αυτή επιφέρει.

Αναφορές

1. García-Roa M, Del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, Pedraza AC, González-Fernández A, Martín MP, et al. Red blood cell storage time & transfusion: Current practice, concerns & future perspectives. *Blood Transfus.* 2017;15(3):222–31.
2. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Chou ML, Seghatchian J, Burnouf T, et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):159–67.
3. Burnouf T, Chou ML, Goubran H, Cognasse F, Garraud O, Seghatchian J. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful? *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):137–45.
4. Almizraq RJ, Seghatchian J, Acker JP. Extracellular vesicles in transfusion-related immunomodulation and the role of blood component manufacturing. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2016;55(3):281–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.018>
5. Antonelou MH, Seghatchian J. Update on extracellular vesicles inside red blood cell storage units: Adjust the sails closer to the new wind. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2016;55(1):92–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.07.016>
6. Noulisri E. Quantitation of cell-derived microparticles in blood products and its potential applications in transfusion laboratories. *Lab Med.* 2020;51(5):452–9.
7. Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Güclüler Akpınar G, Sandberg AS, Cao X, et al. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(9).
8. Gao Y, Lv L, Liu S, Ma G, Su Y. Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. *Vox Sang.* 2013;105(1):11–7.
9. Kriebardis A, Antonelou M, Stamoulis K, Papassideri IS. Cell-derived microparticles in stored blood products: Innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfus.* 2012;10(SUPPL. 2):25–38.
10. Stavrou EX. Thromboinflammatory effects of RBC microvesicles. *Blood.* 2020;135(10):708–9.
11. Tissot JD, Bardyn M, Sonogo G, Abonnenc M, Prudent M. The storage lesions: From past to future. *Transfus Clin Biol.* 2017 Sep;24(3):277–84.
12. de Oliveira GP, Welsh JA, Pinckney B, Palu CC, Lu S, Zimmerman A, et al. Human red blood cells release microvesicles with distinct sizes and protein composition that alter neutrophil phagocytosis. *J Extracell Biol.* 2023;2(11).
13. Delobel J, Garraud O, Barelli S, Lefrère J-J, Prudent M, Lion N, et al. Storage lesion: History and perspectives. *World J Hematol.* 2015;4(4):54.
14. Vardaki MZ, Schulze HG, Serrano K, Blades MW, Devine D V., Turner RFB. Non-invasive monitoring of red blood cells during cold storage using handheld Raman spectroscopy. *Transfusion.* 2021;61(7):2159–68.
15. Hess JR. Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2010;43(1):51–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
16. Schoettker P, Marcucci CE, Casso G, Heim C. Revisiting transfusion safety and alternatives to transfusion. *Press Medicale* [Internet]. 2016;45(7–8):e331–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2016.06.023>

17. Yoshida T, Prudent M, D'Alessandro A. Red blood cell storage lesion: Causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus.* 2019;17(1):27–52.
18. Flegel WA, Natanson C, Klein HG. Does prolonged storage of red blood cells cause harm? *Br J Haematol.* 2014;165(1):3–16.
19. Purvis TE, Goodwin CR, De la Garza-Ramos R, Ahmed AK, Lafage V, Neuman BJ, et al. Effect of liberal blood transfusion on clinical outcomes and cost in spine surgery patients. *Spine J.* 2017 Sep;17(9):1255–63.
20. Steiner ME, Assmann SF, Levy JH, Marshall J, Pulkrabek S, Sloan SR, et al. Addressing the question of the effect of RBC storage on clinical outcomes: The Red Cell Storage Duration Study (RECESS) (Section 7). *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2010;43(1):107–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.014>
21. Kostova EB, Beuger BM, Klei TRL, Halonen P, Liefink C, Beijersbergen R, et al. Identification of signalling cascades involved in red blood cell shrinkage and vesiculation. *Biosci Rep.* 2015;35:1–16.
22. Lelubre C, Vincent JL. Relationship between red cell storage duration and outcomes in adults receiving red cell transfusions: A systematic review. *Crit Care.* 2013;17(2):R66.
23. Estcourt LJ, Birchall J, Lowe D, Grant-Casey J, Rowley M, Murphy MF. Platelet transfusions in haematology patients: are we using them appropriately? *Vox Sang.* 2012 Nov;103(4):284–93.
24. Verma A, Agarwal P. Platelet utilization in the developing world: strategies to optimize platelet transfusion practices. *Transfus Apher Sci.* 2009 Oct;41(2):145–9.
25. Valsami S, Pouliakis A, Gavalaki M, Argyrou A, Triantafillou E, Arvanitopoulou E, et al. Platelets transfusion in Greece: Where, when, why? A national survey. *Asian J Transfus Sci.* 2020 Jul;14(2):158–66.
26. Turchinovich A, Drapkina O, Tonevitsky A. Transcriptome of extracellular vesicles: State-of-the-art. *Front Immunol.* 2019;10(FEB).
27. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. *Biomolecules.* 2022 Jun;12(6).
28. Alberro A, Iparraguirre L, Fernandes A, Otaegui D. Extracellular vesicles in blood: Sources, effects and applications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15).
29. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia* [Internet]. 2020;34(12):3126–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>
30. De Paoli SH, Tegegn TZ, Elhelu OK, Strader MB, Patel M, Diduch LL, et al. Dissecting the biochemical architecture and morphological release pathways of the human platelet extracellular vesiculome. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Oct;75(20):3781–801.
31. Weiss R, Gröger M, Rauscher S, Fendl B, Eichhorn T, Fischer MB, et al. Differential Interaction of Platelet-Derived Extracellular Vesicles with Leukocyte Subsets in Human Whole Blood. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1).
32. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):614–27.
33. Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry A.*

2016 Feb;89(2):184–95.

34. Kuo WP, Tigges JC, Toxavidis V, Ghiran I. Red Blood Cells: A Source of Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol.* 2017;1660:15–22.
35. Blood R, Source CA, Kuo WP, Tigges JC, Toxavidis V, Ghiran I. Chapter 2. 2017;1660:1–8.
36. Chen BZ, Xia R. Pro-inflammatory effects after platelet transfusion: a review. *Vox Sang.* 2020;115(5):349–57.
37. Bicalho B, Serrano K, Dos Santos Pereira A, Devine D V., Acker JP. Blood Bag Plasticizers Influence Red Blood Cell Vesiculation Rate without Altering the Lipid Composition of the Vesicles. *Transfus Med Hemotherapy.* 2016;43(1):19–26.
38. Sugawara A, Nollet KE, Yajima K, Saito S, Ohto H. Preventing platelet-derived microparticle formation-and possible side effects-with prestorage leukofiltration of whole blood. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(5):771–5.
39. Nomura S, Okamae F, Abe M, Hosokawa M, Yamaoka M, Ohtani T, et al. Platelets expressing P-selectin and platelet-derived microparticles in stored platelet concentrates bind to PSGL-1 on filtrated Leukocytes. *Clin Appl Thromb.* 2000;6(4):213–21.
40. Gao M, Zhang B, Zhang Y, Chen Y, Xiong J, Wang J, et al. The effects of apheresis, storage time, and leukofiltration on microparticle formation in apheresis platelet products. *Transfusion.* 2018;58(10):2388–94.
41. Saito S, Nollet KE, Ngoma AM, Ono T, Ohto H. Platelet-, leucocyte- And red cell-derived microparticles in stored whole blood, with and without leucofiltration, with and without ionising radiation. *Blood Transfus.* 2018;16(2):145–53.
42. Nollet KE, Saito S, Ono T, Ngoma A, Ohto H. Microparticle formation in apheresis platelets is not affected by three leukoreduction filters. *Transfusion.* 2013;53(10):2293–8.
43. Tudisco C, Jett BW, Byrne K, Oblitas J, Leitman SF, Stroncek DF. The value of pH as a quality control indicator for apheresis platelets. *Transfusion.* 2005;45(5):773–8.
44. Osman A, Hitzler WE, Meyer CU, Landry P, Corduan A, Laffont B, et al. Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs, mRNAs, activation, and function. *Platelets.* 2015 Mar;26(2):154–63.
45. Osman A, Hitzler WE, Ameer A, Provost P, Schubert M. Differential Expression Analysis by RNA-Seq Reveals Perturbations in the Platelet mRNA Transcriptome Triggered by Pathogen Reduction Systems. *PLoS One.* 2015 Jul;10(7).
46. Lu JH, Liu XF, Shao WX, Liu YL, Wei DP, Liu HQ. Phylogenetic analysis of eight genes of H9N2 subtype influenza virus: A mainland China strain possessing early isolates' genes that have been circulating. *Virus Genes.* 2005;31(2):163–9.
47. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: Disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(12):2594–604.
48. Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: Submicron clotting bombs? *Blood Transfus.* 2010;8(SUPPL. 3).
49. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: An approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang.* 2008;95(4):288–97.
50. Thomas S, Beard M, Garwood M, Callaert M, Cardigan R. Platelet concentrates produced

- from whole blood using the Atreus processing system. *Vox Sang.* 2009;97(2):93–101.
51. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, MacKie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2009;96(3):206–12.
 52. <https://courses.lumenlearning.com/module,18> Structure & Function of Blood
 53. κατευθυντήριες οδηγίες μετάγγισης αίματος και των παραγωγών του της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, 2010
 54. www.moh.gov.gr
 55. Οδηγός για την παρασκευή, τη χρήση και τη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων αίματος. Εκδόσεις Συμβουλίου της Ευρώπης. 16η έκδοση, 2010.; AABB. Standards for blood banks and transfusion services 21 ed. Bethesda. MD: Am. Association of Blood Banks, 2002.

Πηγές Εικόνων

a) <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/white-blood-cell>

b) <https://bloodcancer.org.uk/>